



MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, DO ABASTECIMENTO E DA REFORMA AGRÁRIA - MAARA
EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA
Centro de Pesquisa Agroflorestal da Amazônia Oriental - CPATU



JAPAN INTERNATIONAL COOPERATION AGENCY



GERAÇÃO DE TECNOLOGIA AGROINDUSTRIAL PARA O DESENVOLVIMENTO DO TRÓPICO ÚMIDO

Convênio EMBRAPA-CPATU/JICA
1990 - 1995

00326

Geração de tecnologia

1996

LV-2005.00326



30936-1

Belém, PA
1996

ISSN 0101-2835



MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, DO ABASTECIMENTO E DA REFORMA AGRÁRIA - MAARA
EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA
Centro de Pesquisa Agroflorestal da Amazônia Oriental - CPATU



JAPAN INTERNATIONAL COOPERATION AGENCY

GERAÇÃO DE TECNOLOGIA AGROINDUSTRIAL PARA O DESENVOLVIMENTO DO TRÓPICO ÚMIDO

Convênio EMBRAPA-CPATU/JICA
1990-1995

Belém, PA
1996

EMBRAPA - CPATU. Documentos, 85

Exemplares desta publicação podem ser solicitados à:

EMBRAPA - CPATU

Trav. Dr. Enéas Pinheiro, s/n

Telefones: (091) 226 - 6612, 226 - 6622

Telex: (91) 1210

Fax: (091) 226 - 9845

Caixa Postal, 48

66095 - 100 - Belém, PA

Tiragem: 200 exemplares

Unidade:	AI-Sede
Valor aquisição:	
Data aquisição:	
N.º N. Fiscal/Fatura:	
Fornecedor:	
N.º CCS:	
Origem:	Doores
N.º Registro:	326/05

Comissão Editorial

Coordenação: Célio Francisco Marques de Melo

Dilson Augusto Capucho Frazão

Francisco José Câmara Figueirêdo

Revisão Gramatical: Maria de Nazaré Magalhães dos Santos

Composição: Ana Mirtes Maciel Fouró

Paulo Sérgio Oliveira

Silvia Helena Carneiro Matos

Vitor Guilherme de Sousa

Capa: Euclides Pereira dos Santos Filho

EMBRAPA. Centro de Pesquisa Agroflorestal da Amazônia Oriental (Belém, PA). **Geração de tecnologia agroindustrial para o desenvolvimento do trópico úmido.** Belém: EMBRAPA - CPATU / JICA, 1996. p. 305 (EMBRAPA - CPATU. Documentos, 85).

Convênio EMBRAPA - CPATU / JICA

1. Agroindústria - Tecnologia - Brasil - Amazônia.

I. Título. II. Série

CDD: 630.720811

© EMBRAPA - 1996

APRESENTAÇÃO

A região amazônica, pela sua importância, vem sendo discutida nos foros de debate nacionais e internacionais, principalmente quanto à preservação e conservação dos ecossistemas da pujante floresta tropical úmida. Esse fato é motivo de atenção, em virtude de o desenvolvimento agropecuário e florestal e a conservação dos recursos naturais na Amazônia se mostrarem, em princípio, como objetivos contrários. Entretanto, os pesquisadores entendem que, pelo aumento dos conhecimentos científico e tecnológico, esse suposto antagonismo é plenamente superável e, assim, poder-se-á alcançar um equilíbrio estável com elevado nível de sustentabilidade.

Dessa maneira, há necessidade de um esforço maior para o desenvolvimento da Amazônia, onde as "joint ventures" (parcerias) aparecem como alternativas capazes de promover soluções multidimensionais que os problemas ambientais, sociais e econômicos requerem. Um exemplo é o Acordo de Cooperação entre o Brasil e o Japão, através do qual o Centro de Pesquisa Agroflorestal da Amazônia Oriental - CPATU e a Agência de Cooperação Internacional do Japão - JICA vêm desenvolvendo o Projeto "Geração de Tecnologia Agroindustrial para o Desenvolvimento do Trópico Úmido" que visa a geração de tecnologias aplicadas à agricultura, cujos resultados venham propiciar um conhecimento mais amplo dos recursos naturais da região amazônica, bem como o desenvolvimento de tecnologias agroindustriais adequadas às suas peculiaridades.

A conclusão do Projeto no prazo inicialmente proposto é um marco importante para os governos e respectivas instituições envolvidas e, em particular, para a região amazônica. Através desse Projeto foi possível conhecer mais sobre essa complexa região, onde cada nova descoberta ratifica a necessidade de maiores investimentos em Ciência e Tecnologia.

Hoje, o acervo de informações está mais amplo, porém, ainda não é suficiente, tanto que, diante das necessidades de finalizar e/ou aprofundar alguns dos segmentos e com a aquiescência dos parceiros japoneses, este importante Projeto foi prorrogado por mais dois anos.

Esses cinco anos de trabalho entre especialistas brasileiros e japoneses, com o objetivo de buscar alternativas agroindustriais para o desenvolvimento sustentável da Amazônia, deixaram frutos que vão além dos diversos equipamentos que hoje tornam os laboratórios do CPATU mais modernos e eficientes ou dos pesquisadores brasileiros que tiveram o privilégio de aumentar seus conhecimentos através de treinamentos e visitas técnicas realizadas no Japão e dos consultores japoneses que prestaram inestimável contribuição ao desenvolvimento do Projeto.

Hoje sabemos um pouco mais sobre a Amazônia. Os resultados contidos neste Relatório confirmam essa assertiva. Mas é ainda muito pouco diante da magnitude desta Região. Os conhecimentos científicos e as tecnologias geradas nesta fase do Projeto, contudo, subsidiarão outros estudos mais aplicados e permitirão o uso mais ordenado e sustentável desta Região que constitui o mais complexo ecossistema do planeta.

DILSON AUGUSTO CAPUCHO FRAZÃO
Chefe Geral do CPATU-EMBRAPA
Coordenador Brasileiro do Projeto

TSUYOSHI EIDA
Coordenador Japonês do Projeto - JICA

PREFACE

The Amazon region, because of its importance has been the focus of international and national debates, mainly regarding the conservation and preservation of the robust tropical rainforest ecosystems. This fact deserves attention given that the development of agriculture and forestry and the conservation of Amazonia's natural resources, in principle have opposite objectives. However researchers know that, the increase in technical and scientific knowledge, this supposed antagonism may be overcome and thus a stable balance with a high level of sustainability may be achieved.

Considering this, there is a need for greater efforts in the development of Amazonia, where joint ventures (partnerships), with alternatives capable of promoting multi-dimensional solutions, required by the social, environmental and economic problems. An example is the Cooperation Agreement between Brazil and Japan, by which the Centre for Agroforestry Research of the Eastern Amazon - CPATU and the Japanese International Cooperation Agency - JICA, have been developing the Project "Generation of Agro - Industrial Technology for the Development of the Humid Tropics", which aims to generate applied technologies for agriculture, whose results will contribute toward a broader understanding of the natural resources of the amazon region, as well as the development of agro-industrial technologies which are adequate to its peculiarities.

The conclusion of the initially proposed phase is an important mark for the governments and the respective institutions involved and in particular for the Amazon Region. Through the project activities it has been possible to learn more about this complex region, where each new discovery ratifies the necessity for greater investments in Science and Technology.

Today the information accumulated is broader, but it is still not sufficient, such that, given the need to finalise and/or expand some segments and with the acceptance of the Japanese partners, this important project has been prolonged for two more years.

During these five years of united work, which brought together Brazilian and Japanese specialists, with the objective of seeking agro-industrial alternatives for the sustainable development of Amazonia, has left results which go beyond just the supply of equipment that has made the CPATU laboratories more modern and efficient or the privilege given to Brazilian researchers to increase their knowledge through training and technical visits in Japan, and the great contributions made by Japanese consultants to the development of the Project.

Today we know a bit more about Amazonia. The results contained in this Report confirm this affirmation. Nevertheless it is still very little given the magnitude of this Region. The scientific and technological knowledge generated in this phase of the Project, above all, will subsidise other, more applied studies that will allow more organised and sustainable use of resources from this Region which has the most complex ecosystem of the planet.

DILSON AUGUSTO CAPUCHO FRAZÃO

General Director of CPATU-EMBRAPA
Brazilian Coordinator of the Project

TSUYOSHI EIDA

Japanese Coordinator of the Project - JICA

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	11
IDENTIFICAÇÃO E TÉCNICAS DE CRIAÇÃO DE POLINIZADORES DE ESPÉCIES VEGETAIS DE IMPORTÂNCIA ECONÔMICA NO ESTADO DO PARÁ.	17
Experimento 1 - Ecologia da polinização de urucuzeiro (<i>Bixa orellana</i>).	22
Experimento 2 - Ecologia da polinização do bacurizeiro (<i>Platonia insignis</i>).	30
Experimento 3 - Ecologia da polinização do cupuaçuzeiro (<i>Theobroma grandiflorum</i>).	40
Experimento 4 - Ecologia da polinização da castanheira-do-brasil (<i>Bertholletia excelsa</i>).	45
BIOLOGIA E FISILOGIA DE <i>Crinipellis perniciosa</i> DO CUPUAÇUZEIRO, EM RELAÇÃO À FISIOPATOLOGIA.	59
Experimento 1 - Caracterização morfológica de <i>Crinipellis perniciosa</i> de <i>Theobroma</i> spp.	62
Experimento 2 - Comparação morfológica entre isolados de <i>Crinipellis perniciosa</i> de <i>Theobroma</i> spp.	64
Experimento 3 - Compatibilidade somática entre isolados de <i>Crinipellis perniciosa</i> de <i>Theobroma</i> spp.	64
Experimento 4 - Teste de patogenicidade de isolados de <i>Crinipellis perniciosa</i> em <i>Theobroma</i> spp.	66
Experimento 5 - Caracterização bioquímica de isolados de <i>Crinipellis perniciosa</i> de <i>Theobroma</i> spp.	67
Experimento 6 - Produção de basidiocarpos de <i>Crinipellis perniciosa</i> de <i>Theobroma</i> spp. em vassouras destacadas, sob telado.	69
Experimento 7 - Biologia de <i>Crinipellis perniciosa</i> do cupuaçuzeiro - observações de campo.	71
Experimento 8 - Produção artificial de basidiocarpos de <i>Crinipellis perniciosa</i> do cupuaçuzeiro.	78
Experimento 9 - Avaliação fisiológica, bioquímica e de crescimento de plantas de cupuaçuzeiro sadias e infectadas por <i>Crinipellis perniciosa</i>	80
EPIDEMIOLOGIA DA VASSOURA-DE-BRUXA DO CUPUAÇUZEIRO.	83
Experimento 1 - Teste de inoculação com <i>Crinipellis perniciosa</i> em mudas de cupuaçuzeiro.	86

Experimento 2 - Estudo da disseminação de basidiosporos de <i>Crinipellis perniciosa</i> no processo de infecção.	87
Experimento 3 - Relação entre as condições climáticas e o progresso da doença.	87
Experimento 4 - Estudos da produção de basidiocarpos em vassouras-de-bruxa destacadas e não-destacadas.	94
Experimento 5 - Estudo dos parâmetros epidemiológicos em condições de casa-de-vegetação.	99
Experimento 6 - Determinação do ciclo de vida do <i>Crinipellis perniciosa</i> em cupuaçuzeiros (<i>Theobroma grandiflorum</i>).	99
Experimento 7 - Controle químico da vassoura-de-bruxa do cupuaçuzeiro (<i>Theobroma grandiflorum</i>).	102
Experimento 8 - Condução da copa de plantas de cupuaçuzeiro para o controle da vassoura-de-bruxa.	102
Experimento 9 - Controle integrado da vassoura-de-bruxa do cupuaçuzeiro.	103
Experimento 10 - Produção de basidiocarpos em vassouras-de-bruxa cortadas e não-cortadas sobre liteira.	104
LEVANTAMENTO DE MICRORGANISMOS POTENCIALMENTE ATIVOS CONTRA <i>Fusarium solani</i> f.sp. <i>piperis</i>.	109
Experimento 1 - Inibição <i>in vitro</i> do crescimento micelial de <i>Fusarium solani</i> f.sp. <i>piperis</i> por antagonistas.	111
Experimento 2 - Patogenicidade do micélio de <i>Fusarium solani</i> f.sp. <i>piperis</i> após inibição <i>in vitro</i> por antagonistas.	112
Experimento 3 - Esporulação <i>in vitro</i> de <i>Fusarium solani</i> f.sp. <i>piperis</i> na presença de antagonistas.	113
Experimento 4 - Inibição da germinação de esporos de <i>Fusarium solani</i> f.sp. <i>piperis</i> por antagonistas.	114
Experimento 5 - Influência da concentração da suspensão de esporos de <i>Fusarium solani</i> f.sp. <i>piperis</i> no aparecimento de sintomas de fusariose em "seedlings" de pimenta-do-reino.	115
Experimento 6 - Controle biológico da fusariose da pimenta-do-reino através de microrganismos antagônicos.	116
Experimento 7 - Controle da fusariose da pimenta-do-reino através de proteção cruzada.	118
Experimento 8 - Controle biológico da fusariose da pimenta-do-reino através de micorrizas vesicular-arbusculares.	120

EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO ÓLEO E OLEORRESINA DA PIMENTA-DO-REINO.	125
Experimento 1 - Extração do óleo essencial e da resina da pimenta-do-reino.	129
Experimento 2 - Obtenção do oleorresina em pó.	135
Experimento 3 - Utilização, em indústrias brasileiras de alimentos e de cosméticos, do oleorresina e do óleo essencial.	136
COMPORTAMENTO DE GERMOPLASMA DE PIMENTA-DO-REINO EM RELAÇÃO À PRODUTIVIDADE E RESISTÊNCIA A DOENÇAS EM REGIÕES DA AMAZÔNIA BRASILEIRA.	139
Experimento 1 - Comportamento de germoplasma de pimenta-do-reino em áreas de ocorrência de fusariose.	142
Experimento 2 - Obtenção de mutantes de pimenta-do-reino resistentes à fusariose através da radiação gama.	153
Experimento 3 - Conservação de germoplasma de <i>Piper nigrum</i> através da enxertia em <i>piper colubrinum</i>	155
CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DE GERMOPLASMA DE FRUTEIRAS.	161
Experimento 1 - Eletroforese em gel utilizando pimenta-do-reino, cupuaçu e urucu.	163
Experimento 2 - Análise de eletroforese de isoenzimas utilizando espécies tropicais.	164
Experimento 3 - Caracterização genética de acessos do Banco de Germoplasma de pimenta-do-reino, utilizando eletroforese de isoenzimas.	164
ESTUDO PARA IDENTIFICAÇÃO DE VEGETAIS PRODUTORES DE CORANTES, OCORRENTES NA FLORA AMAZÔNICA.	173
Experimento 1 - Urucu (<i>Bixa orellana</i>).	176
Experimento 2 - Açaí (<i>Euterpe oleracea</i>).	183
Experimento 3 - Cará-roxo (<i>Dioscorea alata</i>).	186
Experimento 4 - Jenipapo (<i>Genipa americana</i>).	189
MELHORAMENTO DE PLANTAS DE INTERESSE ECONÔMICO PARA A REGIÃO AMAZÔNICA ATRAVÉS DE TÉCNICAS "IN VITRO".	195
COLETA, PROPAGAÇÃO E AVALIAÇÃO DE PLANTAS MEDICINAIS DA AMAZÔNIA.	237
Experimento 1 - Coleta, propagação e conservação de <i>Cephaelis ipecacuanha</i> (Brot) A. Rich, "ipeca", <i>Pilocarpus microphyllus</i> Stapf. "jaborandi".	240
Experimento 2 - Análise fitoquímica de plantas medicinais.	253

Experimento 3 - Estudos agrônômicos e fisiológicos de plantas medicinais nativas da Amazônia em processo de domesticação.	272
ANEXO I - Relação dos documentos gerados a partir do Convênio de Cooperação Técnica entre o CPATU e a JICA.	289
ANEXO II - Peritos japoneses que prestaram consultoria no CPATU.	295
ANEXO III - Treinamento de pessoal do CPATU no Japão, de acordo com a área de capacitação.	297
ANEXO IV - Relação de equipamentos enviados pelo Governo Japonês ao CPATU. .	298
ANEXO V - Investimentos feitos pela EMBRAPA - CPATU como contra-parte no Convênio de Cooperação Técnica com a JICA.	305

INTRODUÇÃO

O Projeto Geração de Tecnologia Agroindustrial para o Desenvolvimento do Trópico Úmido surgiu da necessidade de ampliar o conhecimento do potencial dos recursos renováveis disponíveis na Amazônia que permitisse a geração de tecnologia agroflorestal adequada às condições ecológicas, através de treinamento de recursos humanos, qualificando-os para a implementação de um programa mais amplo que envolvesse a ocupação ordenada e o desenvolvimento da região.

Os primeiros passos para a concretização do convênio foram dados em 1986, envolvendo o então Centro de Pesquisa Agropecuária do Trópico Úmido (CPATU), atual Centro de Pesquisa Agroflorestal da Amazônia Oriental, e a Japan International Cooperation Agency (JICA), que oficializaram esse compromisso de cooperação técnica, entre o Brasil e o Japão, no dia 20 de junho de 1990.

Após cinco anos de execução, foi acumulado um acervo considerável de informações, oriundo do Projeto Geração de Tecnologia Agroindustrial para o Desenvolvimento do Trópico Úmido. Foram estudadas várias espécies vegetais no que se refere à coleta, propagação e avaliação, dentre as quais algumas plantas medicinais nativas da Amazônia; o cupuaçuzeiro, que é uma cultura de grande valor econômico para a região, com destaque para as pesquisas fitopatológicas, estudos da biologia e fisiologia da vassoura-de-bruxa, principal doença, dando-se ênfase à epidemiologia.

O acervo de conhecimentos foi enriquecido com as pesquisas sobre a fusariose, que é a principal e a mais prejudicial doença que ataca a pimenta-do-reino. Foram realizados levantamentos de microrganismos potencialmente ativos contra a fusariose e estudos sobre o comportamento de germoplasma dessa piperácea em relação à produtividade e à resistência de doenças. As fruteiras mereceram um capítulo à parte, com a caracterização química daquelas de maior importância econômica para a região.

O Projeto permitiu ainda a realização de estudos voltados para a identificação e técnicas de criação de polinizadores de espécies vegetais no Estado do Pará.

Durante a fase de execução das pesquisas houve um incremento considerável no aperfeiçoamento dos recursos humanos, sendo que 21 pesquisadores do CPATU receberam treinamentos no Japão, nas diversas áreas de atuação do projeto. Por outro lado, 23 peritos japoneses prestaram consultorias a curto e longo prazos, às pesquisas desenvolvidas no CPATU, em Belém, através do acompanhamento, assessoramento e condução dos subprojetos de pesquisa programados. E para tornar viável e operacional todas as fases do convênio de cooperação, cerca de US\$ 2,800.000 foram aplicados na aquisição de novos e modernos equipamentos que se encontram instalados nos Laboratórios de Agroindústria, Fitopatologia, Entomologia e Biotecnologia do CPATU.

Os cinco anos iniciais dessa cooperação, porém, foram insuficientes para que parte dos projetos em andamento fosse concluída e uma possível paralisação representaria prejuízos incalculáveis para a pesquisa regional. Após negociações, avaliações e análises detalhadas, o Projeto foi prorrogado por mais dois anos, o que possibilitará a obtenção de resultados mais abrangentes, conclusivos e por isso mesmo, passíveis de adoção imediata por parte da comunidade amazônica, a grande beneficiada pelo trabalho de cooperação técnica nipo-brasileiro desenvolvido no CPATU.

INTRODUCTION

The Project Generation of Agroindustrial Technology for the Development of the Humid Tropics was created with the aim of expanding the knowledge on the potential of renewable natural resources of Amazonia. The objective was to enable the development of an agroforestry technology suited to the particular ecological conditions of the region, through the training of human resources, thereby qualifying them to implement an even broader program involving the orderly occupation and development of the region.

The first steps towards the implementation of this agreement were taken in 1986, involving what was formerly the Center for Agricultural/ Cattle-raising Research in the Humid Tropics, currently Center for Agroforestry Research in Eastern Amazonia (CPATU) and the Japan International Cooperation Agency (JICA). This commitment to technical cooperation between Japan and Brazil was made official on June 20, 1990, when the Project effectively began.

A considerable amount of knowledge has been gathered in the five years the Project: Generation of Agro-industrial Technology for Development of the Humid Tropics has been underway. Several subjects have been studied such as medicinal plants in Amazonia, in terms of harvesting, propagation and evaluation; the cupuaçu tree, a species of great economic importance to the region was studied mainly on its phytopathological aspect, dealing with the biology, physiology and epidemiology of its main disease "witch broom".

To this body of knowledge was added research on fusarium, the main and most devastating disease attacking the black pepper plant. Surveys were carried out on potentially active micro-organisms which act against fusaria, as well as the behavior of black pepper germoplasm in terms of productivity and resistance to diseases. Fruit species was another area studied, with the chemical characterization of those species of greatest economic importance to the region.

Also thanks to the agreement between the Japanese and the Brazilian Governments, a project was carried out to identify techniques for raising pollinators of different plant species in the state of Pará.

During the execution phase of the Project there was a considerable increase in the qualification of the Brazilian human resources. Twenty-one researchers from the Center for Agroforestry Research in Eastern Amazonia (CPATU) went to Japan for training within their areas of expertise. Also, twenty-three Japanese consultants came to Belém on either short- or long-term consultancies; monitoring, aiding and participating with the research projects underway.

In order for this joint cooperation to become feasible and operational in all its different phases, approximately US\$ 2,800,000 was invested in new, modern and sophisticated equipment which are now installed in the CPATU Laboratories of Agroindustry, Phytopathology, Entomology and Biotechnology.

The last five years have not been sufficient, however, to conclude certain projects and a discontinuation would represent great losses for both parts. After much negotiation, evaluation and detailed analysis, it was decided that the Project would be extended for two more years, which will allow more conclusive and broader results. This, in turn, will permit immediate application by the Amazonian community, those most benefited by this Nipo-Brazilian technical cooperation developed at CPATU.

POLINIZAÇÃO DE PLANTAS AMAZÔNICAS

IDENTIFICAÇÃO E TÉCNICAS DE CRIAÇÃO DE POLINIZADORES DE ESPÉCIES VEGETAIS DE IMPORTÂNCIA ECONÔMICA NO ESTADO DO PARÁ

Márcia Motta Maués¹
Giorgio Cristino Venturieri²
Lindáurea Alves de Souza³
Jun Nakamura⁴

Resumo: Foram estudados, quanto aos aspectos reprodutivos, o urucuzeiro (*Bixa orellana*), o bacurizeiro (*Platonia insignis*), o cupuaçuzeiro (*Theobroma grandiflorum*) e a castanheira-do-brasil (*Bertholletia excelsa*), espécies vegetais nativas da Amazônia de grande importância econômica para a região. Os experimentos foram conduzidos nos campos experimentais da EMBRAPA-CPATU, em Belém, Tracuateua, Tomé-açu e Capitão-Poço, Estado do Pará, tendo como objetivo final o manejo, em laboratório e no campo, de seus respectivos polinizadores. Foram encerrados os estudos com o urucu e o bacuri onde investigaram-se os sistemas reprodutivos e os respectivos polinizadores e visitantes das flores. Concluiu-se que o urucuzeiro é uma planta que apresenta autogamia e alogamia, porém sua produtividade é superior quando polinizada por abelhas vibradoras e, nas áreas estudadas, não apresentou problemas de polinização. O bacurizeiro é uma planta alógama, com síndrome de polinização ornitófila, onde os principais agentes polinizadores, no nordeste do Estado do Pará, pertencem à família *Psittacidae*, que constituem-se em excelentes polinizadores, visto que possuem grande alcance de voo e, desta forma, podem efetuar a troca gênica entre populações distantes entre si, fator preponderante em espécies alógamas. O cupuaçuzeiro e a castanheira-do-brasil permanecem sob investigação, onde nesta segunda etapa do projeto, pretende-se desenvolver técnicas de manejo para os respectivos polinizadores, pois constatou-se que existe a necessidade de incremento dos mesmos, devido ao baixo índice de frutificação.

¹ Biol. M.Sc. EMBRAPA - CPATU. Caixa Postal 48. CEP 66.017-970. Belém, PA.

² Eng. Agr. M.Sc. EMBRAPA - CPATU.

³ Eng. Agr. Ph.D. EMBRAPA - CPATU.

⁴ Consultor da Japan International Cooperation Agency - JICA. Av. Nazaré, 272, Sala 105, Ed. Clube de Engenharia. CEP 66.035-170. Belém, PA.

IDENTIFICATION AND TECHNIQUES FOR RAISING POLLINATORS OF PLANT SPECIES ECONOMICALLY IMPORTANT TO THE STATE OF PARÁ

Abstract: The reproductive aspects of the following species were studied: urucum (*Bixa orellana*), bacuri (*Platonia insignis*), cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*) and brazilnut (*Bertholletia excelsa*). These species are native to Amazonia and have great economic importance to the region. The experiments were conducted on the experimental fields of EMBRAPA-CPATU in Belém, Tracuateua, PA, Tomé-Açu, PA and Capitão Poço, PA. The main objective was the management of their respective pollinators both in the laboratory and in the field. At present, only the studies with urucu and bacuri have been completed on their reproductive systems, respective pollinators and visitors to their flowers. Urucum has been found to be both alogamous and autogamous, its productivity, however, is superior when pollinated by vibrating bees. In the areas studied, it presented no problems in terms of pollination. Bacuri is an alogamous plant, with ornitophilous pollination syndrome. Its main pollinators in the northeast of the state are parakeets, belonging to the *Psittacidae* family. They are excellent pollinators of this plant, due to their long flying distance that can thereby exchange genetic material between populations physically distant from each other, a preponderant factor in alogamous species. Cupuaçu and brazilnut are still under investigation. In this stage of the project, we intend to develop management techniques for the pollinators, as there is a need to increase them, due to the low productivity of these species.

Objetivo

Identificar os polinizadores de quatro plantas nativas de importância econômica na Amazônia Oriental, urucuzeiro, bacurizeiro, cupuaçuzeiro e castanheira-do-brasil e desenvolver técnicas de criação e manejo dos principais polinizadores, em laboratório ou no campo, visando o aumento da polinização natural.

Justificativa

Por razões de ordem genética e evolutiva, as plantas evitam a autofecundação, que resulta da polinização direta. A heterostilia, androceu e gineceu em planos diferentes; a dicogamia, maturação do gineceu e androceu em épocas diferentes; e a hercogamia, presença de barreira morfológica impedindo a polinização direta, são recursos que o vegetal pode dispor para evitar a autofecundação. Esses mecanismos tornam necessária a presença de agentes polinizadores que realizam, de maneira eficiente, a transferência de pólen de uma flor para outra, com vistas à formação de frutos e sementes.

O conhecimento dos agentes polinizadores de uma espécie vegetal é informação básica e essencial para o melhor entendimento dos mecanismos naturais de reprodução, principalmente em espécies amazônicas, onde os casos de auto-esterilidade e incompatibilidade entre variedades são muito comuns.

Na maioria das angiospermas, a polinização por insetos é resultante de um padrão de evolução mútua, entre insetos e plantas, que assegura a sobrevivência de ambos. Os insetos executam um papel vital na polinização de muitas espécies vegetais, incluindo algumas das plantas cultivadas mais importantes. A polinização é essencial à perpetuação da maioria das espécies, porém, muitos fatores podem afetá-la negativamente, pois trata-se de um processo complexo e influenciado por muitos efeitos superpostos somente descobertos após exaustivas observações no campo, no local de origem da planta.

Foram realizados numerosos estudos sobre técnicas de cultivo e aproveitamento industrial de diversas plantas amazônicas, tais como, a castanheira-do-brasil, o cupuaçuzeiro, o urucuzeiro e o bacurizeiro, entre outras, mas pouco se sabe a respeito da entomofauna polinizadora relacionada a essas plantas.

A produção de castanha-do-brasil baseia-se no extrativismo, e, apesar disso, é um dos principais produtos da pauta de exportação da Amazônia. A castanheira destaca-se como uma das plantas mais nobres e valiosas da floresta Amazônica. Suas amêndoas são apreciadas no mundo inteiro, consumidas "in natura" ou usadas para diversos fins culinários; foram denominadas

de "carne vegetal" por Botazzi, devido ao seu alto valor biológico, em face da quantidade e qualidade dos ácidos aminados que apresentam.

O principal período de floração vai de meados de outubro a meados de dezembro. Porém, a relação entre a floração e a frutificação na castanheira é baixíssima, cerca de 0,4%. Estudos realizados relatam a presença de himenópteros dos gêneros *Bombus*, *Centris*, *Xylocopa*, *Eulaema* e *Epicharis* nas flores da castanheira, indicando-os como polinizadores, porém falta uma investigação maior na identificação em nível de espécie e sobre biologia das mesmas.

O cupuaçuzeiro é uma espécie de comprovado potencial econômico. Desenvolve-se espontaneamente nas matas da região amazônica e é ideal para o desenvolvimento da fruticultura regional. Do fruto aproveita-se a polpa, que envolve as sementes, utilizada no fabrico de doces, sucos, compotas, licores, etc. As sementes, após a secagem, permitem o preparo de um tipo de chocolate muito apreciado e com grande potencialidade para o aproveitamento industrial. A produção atual do cupuaçuzeiro é proveniente, em sua maioria, do extrativismo e semi-extrativismo, porém, esse quadro está se modificando, com o desenvolvimento de estudos sobre métodos de propagação, tratos culturais, produtividade e tecnologia de aproveitamento do fruto, que viabilizam a implantação de cultivos racionais.

Nas regiões de clima Af, a época de floração se estende de junho a março, com o pico entre novembro a janeiro, a frutificação estende-se de novembro a junho.

Ocorre no cupuaçuzeiro uma produção de flores em número muito elevado em relação ao número de frutos produzidos. Caso semelhante ocorre no cacaueiro (*Theobroma cacao*), situação que tornou-se conhecida como "síndrome de gratificação do inseto", uma relação mutualista que representa o mais alto evento da evolução conjunta das angiospermas e seus insetos polinizadores, que se beneficiam uns aos outros, ou seja, as flores são melhor polinizadas e os insetos ficam melhor alimentados.

Os insetos que realizam a polinização do cacaueiro já são conhecidos, trata-se de moscas do gênero *Forcypomia* (Ceratopogonidae) e, as pesquisas nesse campo, alcançaram o nível de criação em laboratório e estímulo à preservação de criatórios naturais, em áreas próximas aos

plantios, visando ao aumento da polinização. No caso do cupuaçuzeiro, encontram-se poucos dados na bibliografia sobre a fenologia e quase nada sobre os insetos que efetuam a polinização.

A importância econômica do urucuzeiro reside no aproveitamento do corante natural contido nas sementes - a bixina, cuja utilização é muito variada: tinturaria, cosméticos, culinária, indústria alimentícia, repelente contra insetos por índios brasileiros e na alimentação de frango, como fonte de caroteno para melhorar a coloração da gema do ovo, entre outros. Como está prevista a eliminação dos corantes sintéticos, em grande parte do mundo desenvolvido, começam a crescer os investimentos na produção de substâncias naturais, onde o urucu poderá ocupar um lugar de destaque devido às diversas qualidades de corante encontradas, tais como, inocuidade, coloração atrativa e estabilidade à luz e ao calor.

O urucuzeiro floresce e frutifica simultaneamente em todos os meses do ano. Estudos desenvolvidos na Costa Rica relatam que a polinização é efetuada por insetos da ordem Hymenoptera, não havendo maior esclarecimento quanto às espécies envolvidas no processo de polinização.

O bacurizeiro é uma fruteira arbórea que existe em estado silvestre nas matas de terra firme de toda Amazônia, com área de concentração no estuário do rio Amazonas.

É uma das frutas mais populares do Estado do Pará, seu maior produtor. Os frutos podem ser consumidos "in natura" ou utilizados no preparo de doces, cremes, sorvetes, pudins, etc.

O bacurizeiro floresce regularmente entre junho e julho, e a frutificação estende-se de dezembro a maio. Não foram encontrados dados na literatura sobre seus polinizadores.

A introdução de insetos polinizadores em plantações (ensaios de polinização entomófila) está se tornando uma prática comum em diversas plantas cultivadas em todo o mundo. Muitos estudos destacam a importância do manejo de insetos polinizadores, especialmente as abelhas, na agricultura sustentada. Tal procedimento tem demonstrado claramente que o aumento da população dos polinizadores nas áreas de plantio conduz a um aumento na produção de frutos.

Assim, a criação e manejo de insetos polinizadores visando o incremento da polinização natural, representa uma excelente alternativa para o aumento da produtividade das plantas selecionadas neste projeto.

Resultados Parciais

Experimento 1 - Ecologia da polinização do urucuzeiro

O urucuzeiro é uma planta nativa da América tropical que tem despertado interesse em muitos produtores, devido à presença dos corantes bixina e norbixina nas sementes. Muitos estudos sobre técnicas de cultivo, produção, manejo e aproveitamento industrial têm sido realizados, porém, pouco se conhece sobre a ecologia da polinização, e, particularmente sobre a entomofauna associada a este processo.

Os estudos foram desenvolvidos no Campo Experimental da EMBRAPA-CPATU, em Belém, PA. Foram sorteados oito indivíduos, em um plantio da variedade "Piave Vermelha", implantado em abril de 1989, excluindo-se as plantas situadas na bordadura.

Foram realizadas observações botânicas quanto à morfologia, recursos e atrativos característicos das flores, horário de abertura (antese), reflexão de raios ultra-violeta - submetendo as flores a vapores de hidróxido de amônia e depois observando-as sob luz ultra-violeta e localização de osmóforos na flor - mergulhando as flores em solução aquosa de vermelho neutro, por duas horas. Determinou-se o número de anteras, utilizando-se microscópio estereoscópico, e de óvulos, com o auxílio de microscópio ótico e lâmina Neubauer, bem como a razão pólen/óvulo e pólen/flor. Foram utilizadas 20 flores para a contagem de anteras e óvulos, das quais dez foram protegidas (um dia antes da antese) e 36 anteras para contagem de grãos de pólen.

Foram coletados dados de fenologia reprodutiva a cada duas semanas nas plantas previamente selecionadas, no período de 06/06/90 a 17/06/92. Os dados obtidos foram relacionados a registros meteorológicos (temperatura do ar; umidade relativa do ar; precipitação pluviométrica e insolação) fornecidos pelo Laboratório de Climatologia da EMBRAPA-CPATU.

Para se determinar o tempo decorrente entre a fecundação e o ponto de colheita, bem como a curva de maturação do fruto do urucuzeiro, 100 frutos foram acompanhados desde a fecundação da flor até o estado de fruto maduro, sendo medidos com paquímetro, a cada dois dias, ao longo do desenvolvimento.

Foi determinado o percentual de frutificação decorrente da polinização natural, acompanhando-se o desenvolvimento de 100 frutos, observando-se a cada duas semanas o número de frutos que permaneciam na planta, nos períodos de 08/05/91 a 25/06/91 (período mais seco) e 21/02/92 a 23/03/92 (período mais úmido).

O sistema reprodutivo do urucuzeiro foi investigado no período de 09/01 a 22/01/92, efetuando-se uma série de cruzamentos controlados em 25 flores distribuídas em cinco plantas diferentes, de acordo com a metodologia a seguir:

- A) Xenogamia sem emasculação - um dia antes da antese, os botões foram cobertos com sacos de papel impermeável e, no dia seguinte, esses botões receberam pólen de uma planta diferente;
- B) Xenogamia com emasculação - o mesmo procedimento usado em A, precedido da retirada dos estames;
- C) Geitonogamia sem emasculação - um dia antes da antese, os botões foram ensacados e, no dia seguinte, receberam pólen de outras flores da mesma planta;
- D) Geitonogamia com emasculação - o mesmo procedimento usado em C, precedido da retirada dos estames dos botões selecionados;
- E) Autopolinização manual - um dia antes da antese os botões foram ensacados e, no dia seguinte, foram vibrados dentro dos sacos de proteção;
- F) Autopolinização espontânea - os botões foram apenas ensacados;
- G) Emasculação sem polinização (Apomixia) - os botões foram emasculados e ensacados;
- H) Testemunha - foram etiquetados 25 botões.

Esses testes foram repetidos no período de 11/01 a 22/03/93, substituindo-se os sacos de papel impermeável por sacos de plástico previamente furados com alfinete, devido à ineficiência do material anterior em resistir às fortes chuvas tropicais. Na repetição dos testes, observou-se também o tempo de formação dos frutos e o número médio de sementes formadas.

Os insetos visitantes foram coletados e identificados por comparação com coleções do Museu Paraense Emílio Goeldi e do CPATU, e enviados a especialistas do Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo - USP, Instituto de Biociências da USP e da Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto - USP. Espécimes de polinizadores coletados foram depositados na coleção entomológica da EMBRAPA-CPATU. Durante as visitas, foi observado o comportamento dos insetos, adaptações morfológicas que facilitassem a coleta e o transporte de pólen, o horário de visita às flores e o recurso floral coletado. O comportamento dos insetos nas flores foi registrado através de fotografias.

Observou-se que as flores do urucuzeiro são poliândricas e produzem pólen em abundância, utilizado principalmente por abelhas fêmeas na alimentação da prole. Estão agrupadas terminalmente em uma inflorescência do tipo cacho de monocásio. São actinomorfas, cíclicas e hermafroditas. Possuem cinco sépalas, cinco pétalas de coloração róseo-clara a branca e anteras amarelas de deiscência poricida. Possuem um tênue aroma adocicado e agradável. Começam a abrir pouco antes do amanhecer, em torno das cinco horas da manhã, levando cerca de uma hora para abrir totalmente (considerou-se como o início da abertura da flor o momento em que as pétalas começam a se afastar, expondo os órgãos reprodutivos).

Quando testadas com hidróxido de amônia e observadas sob luz ultravioleta, as anteras e as porções média e apical do estigma mostraram-se bastante fluorescentes. Utilizando-se solução de vermelho neutro, as anteras, a porção apical do estigma e os bordos das pétalas ficaram medianamente corados, evidenciando osmóforos nestas regiões. Assim, acredita-se que o reconhecimento das flores pelos insetos visitantes, à curta distância, ocorra não através do olfato, mas sim da visão.

A produção de néctar está restrita a nectários extra-florais situados na porção terminal do pedúnculo.

O número médio de estames por flor foi de $419 \pm 16,5$, nas previamente protegidas. O número médio de grãos de pólen por flor foi de 1.317.241,08. A proporção pólen/óvulo foi de 23.627, e o número médio de óvulos/flor, de 55,75.

As observações fenológicas demonstraram que o urucuzeiro floresce e frutifica durante quase o ano todo, porém, existem períodos de maior e menor produção. Nos meses de julho a setembro, pouco foi observada a presença de flores, bem como houve redução na produção de botões e frutos, enquanto que nos meses de janeiro a maio houve grande produção de botões, flores e frutos (Fig. 1). O período de maior atividade reprodutiva do urucuzeiro coincidiu com os meses onde os registros de temperatura e insolação foram os mais baixos, e de umidade relativa e precipitação os mais elevados do ano, ou seja, de janeiro a maio.

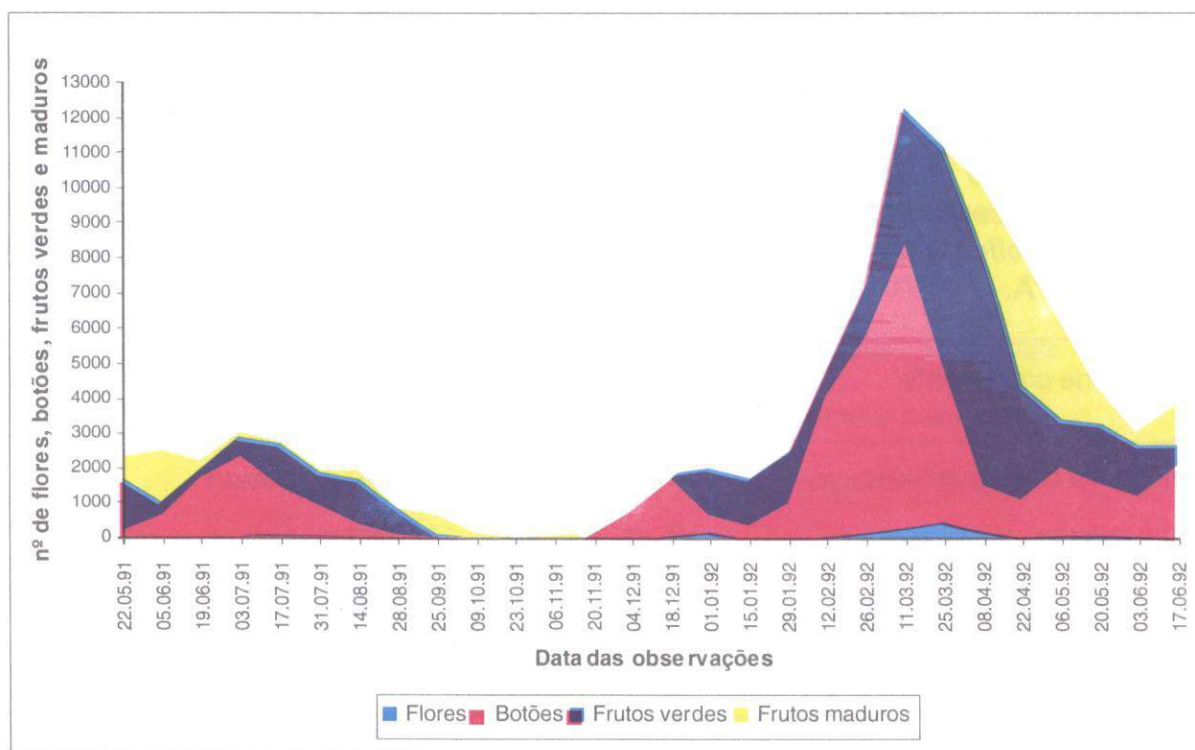


FIG. 1 - Fenofases reprodutivas de urucuzeiro (*Bixa orellana*) no período de maio de 1991 a junho de 1992, em Belém, PA.

Com relação ao desenvolvimento do fruto, verificou-se que o período de crescimento teve a duração de 40 a 45 dias, quando o fruto atingiu o tamanho médio de $40,9 \pm 2,97$ mm de altura por $25,7 \pm 2,67$ mm de diâmetro.

Os testes sobre sistema reprodutivo indicaram que o urucuzeiro é uma planta de polinização cruzada (alógama), mas que apresenta também autogamia (Tabelas 1 e 2).

TABELA 1 - Percentual de frutificação de *B. orellana*, resultante de diversos cruzamentos controlados em Belém, PA, no período de 09 a 22 de janeiro de 1992.

Tipos de cruzamentos	Frutificação (%)
Xenogamia c/ emasculação	60
Xenogamia s/ emasculação	76
Geitonogamia c/ emasculação	56
Geitonogamia s/ emasculação	44
Autopolinização Manual	80
Autopolinização Espontânea	28
Apomixia	12
Controle	52

TABELA 2 - Tempo de formação do fruto, percentual de frutificação e número médio de sementes, resultante de diversos cruzamentos controlados em *Bixa orellana*, no período de 11 de janeiro a 22 de março de 1993, em Belém, PA.

Tipos de cruzamento	Desenvolvimento do fruto (Dias)	Frutificação (%)	Número médio de sementes
Xenogamia c/ emasculação	40-45	65	43
Xenogamia s/ emasculação	40-45	80	49
Geitonogamia c/ emasculação	40-45	60	42
Geitonogamia s/ emasculação	40-45	62	46
Autopolinização manual	40-45	85	50
Autopolinização espontânea	40-45	32	35
Apomixia	45-50	5	—
Controle	40-45	55	47

A presença de alogamia e autogamia em taxas muito semelhantes demonstra que pode ocorrer autofecundação em flores de urucuzeiro, entretanto observando-se os resultados dos testes de sistema reprodutivo, quanto à xenogamia e autopolinização espontânea, verificou-se que a importância dos agentes polinizadores está diretamente relacionada à frutificação e produção de sementes, que alcança maiores índices quando há interferência de agentes externos de polinização.

Um grande número de insetos é atraído pelas flores do urucuzeiro. Os principais polinizadores encontrados constam na Tabela 3.

TABELA 3 - Insetos polinizadores de urucuzeiro na região de Belém, PA.

Família	Espécie
Anthophoridae	<i>Xylocopa frontalis</i>
Anthophoridae	<i>Xylocopa aurulenta</i>
Anthophoridae	<i>Epicharis rustica</i>
Anthophoridae	<i>Epicharis (Hoplepicharis) affinis</i>
Anthophoridae	<i>Centris similis</i>
Apidae	<i>Bombus transversalis</i>
Apidae	<i>Bombus brevivillus</i>
Apidae	<i>Eulaema cingulata</i>
Apidae	<i>Eulaema meriana</i>
Apidae	<i>Melipona melanoventer</i>
Apidae	<i>Euglossa</i> sp.

As espécies relacionadas na Tabela 3 são abelhas de médio a grande porte (12mm a 28mm). Quando chegam à flor, pousam nos estames, segurando-os com suas mandíbulas e pernas, realizando um movimento vibratório. O pólen é liberado em forma de nuvem, caindo sobre o estigma e pétalas da flor, bem como sobre o corpo da abelha, onde é posteriormente transferido à escopa (no caso dos Anthophoridae) e à corbícula (no caso dos Apidae). No momento da vibração, um zumbido característico pode ser ouvido a até cinco metros de distância. Este mecanismo de

polinização por vibração é conhecido como "buzz-pollination". Estas abelhas chegam às flores logo aos primeiros raios de sol, cerca de quinze minutos após a antese. O movimento de visitas é bastante intenso até às 8:30 horas da manhã, depois diminui progressivamente.

Além dessas espécies, foi observada a presença de *Trigona fulviventris* forçando a retirada de pólen pelo orifício das anteras. *Apis mellifera*, *Trigona* sp. e um díptera da família *Syrphidae* recolhem o pólen que cai nas pétalas por ação das abelhas vibradoras.

Foi observada a presença de vespas (*Polistes* sp.) e de formigas (*Solenopsis saevissima*) coletando o néctar produzido nos nectários extra-florais. *S. saevissima* foi encontrada constantemente nas inflorescências, como se estivesse "patrulhando" o local (Tabela 4).

TABELA 4 - Outros insetos relacionados às flores do urucuzeiro em Belém, PA.

Família	Espécie	Comportamento
Apidae	<i>Trigona fulviventris</i>	"Ordenha" as anteras para coletar pólen
Apidae	<i>Trigona</i> sp.	"Catadora" de pólen
Apidae	<i>Apis mellifera</i>	Idem
Syrphidae	<i>Eristalis</i> sp.	Idem
Formicidae	<i>Solenopsis saevissima</i>	Protege afídeos em nectários extra-florais, realiza patrulha
Formicidae	Não identificada	Idem
Vespidae	<i>Polistes infuscatus</i>	Predação de visitantes

Dentre os visitantes, os mais frequentes foram *X. frontalis* e *E. Rustica* (Figs. 2 e 3), ambas pertencentes à família Anthophoridae. As abelhas vibradoras são encontradas em todas as famílias de Apoidea, com exceção de Megachilidae. As abelhas do gênero *Xylocopa* são polinizadoras importantes de diversas plantas tropicais, inclusive de algumas culturas de importância econômica como feijão, mamão "papaya" e maracujá. A *E. rustica* é uma das espécies que contribui na polinização da castanha-do-brasil. As abelhas visitantes do urucuzeiro nidificam, de um modo geral, em florestas, sendo importante haver mata próximo aos plantios, para garantir a presença destes indivíduos e a manutenção da polinização natural.

O comportamento de *T. fulviventris*, fenômeno conhecido pelo termo "milking", pois assemelha-se à ordenha, certamente pouco contribui na polinização do urucuzeiro, visto que estas abelhas não realizam vibração, são de tamanho diminuto e ao chegarem nas flores, pousam diretamente sobre os estames, não contactando com o estigma, na maioria das vezes. No caso de *A. mellifera* e da outra espécie de *Trigona*, é ainda mais improvável que ocorra polinização, pois as abelhas nem ao menos tocam nos órgãos reprodutivos da flor. As espécies acima estão classificadas como "catadoras".



FIG. 2 - *Xylocopa frontalis* (Anthophoridae) polinizando flor de urucuzeiro (*Bixa orellana*), em Belém, PA.



FIG. 3 - *Epicharis rustica* (Anthophoridae) polinizando flor de urucuzeiro (*Bixa orellana*), em Belém, PA.

Experimento 2 - Ecologia da polinização do bacurizeiro (*Platonia insignis*)

O bacurizeiro (*Platonia insignis* Mart., *Clusiaceae*) foi estudado quanto aos aspectos da biologia reprodutiva, devido à carência de informações sobre este tema e a baixa quantidade de frutos obtidos em relação ao número de flores emitidas.

Os estudos foram basicamente desenvolvidos no Campo Experimental da EMBRAPA-CPATU, situado em Belém, PA, em árvores com idade de oito (enxertadas), doze e 30 anos.

Em 1992, foram feitas observações preliminares com o auxílio de binóculos, sobre o horário de abertura da flor e animais visitantes diurnos. O volume de néctar foi medido com o auxílio de pipetas e provetas milimetradas. A morfologia da flor foi estudada e a zona de receptividade do estigma foi determinada utilizando-se microscópio estereoscópio e peróxido de hidrogênio 130 volumes (H_2O_2) a 0,5%. Foram feitas fotografias para melhor analisar o comportamento dos visitantes nas flores.

No ano de 1993, as observações foram intensificadas, algumas vezes cobrindo as 24 horas do dia, para se determinar o horário da abertura das flores. Realizaram-se observações sobre os visitantes diurnos e noturnos, utilizando binóculo e máquina fotográfica. Nas observações noturnas foi utilizado binóculo sensível a ondas infravermelhas.

Para as observações diurnas, foi feito um levantamento da frequência e diversidade dos insetos visitantes, no horário das 6:00h às 18:00h, coletando-se os indivíduos pousados nas flores abertas de hora em hora, durante 30 minutos. Para este estudo, utilizou-se rede entomológica e frascos mortíferos. Após coletados e mortos, os insetos foram identificados no Laboratório de Entomologia da EMBRAPA-CPATU e no Departamento de Zoologia do Museu Paraense Emílio Goeldi.

Foi investigada a receptividade do estigma, a viabilidade dos grãos de pólen e o teor de glicose do néctar (grau Brix). Para isso, foram coletadas três flores a cada hora, das 6:00h às 18:00h, e levadas ao laboratório onde retiravam-se os estigmas mergulhando-os em peróxido de hidrogênio 130 volumes a 0,5%, observando-se a intensidade de formação de bolhas de ar (indicativo da receptividade); para o estudo da viabilidade dos grãos de pólen, coletava-se o pólen em lâminas, corava-se com "Cotton Blue" em Lactophenol e observava-se sob estereomicroscópio; os grãos corados de azul eram considerados viáveis.

O grau Brix foi determinado utilizando-se tubos capilares e refratômetro portátil devidamente calibrado. Foi feita a classificação botânica da flor. Investigou-se a presença de osmóforos, mergulhando as flores em solução de vermelho neutro, a 1%, por duas horas, e pigmentos, submetendo-as a vapores de hidróxido de amônia, a 5%.

Investigou-se o sistema reprodutivo através de polinizações controladas entre três indivíduos enxertados com oito anos de idade, conforme metodologia a seguir: após a coleta das flores, as mesmas foram fixadas em solução de FAA (30% formol, 10% ácido acético e 60% álcool) e assim mantidas até o momento do preparo para a observação. Este preparo consistia nas seguintes etapas: 1) lavagem das amostras em água corrente por 30'; 2) amolecimento em solução 4M de NaOH, por 6h; 3) lavagem por 4h, para retirada dos resíduos e estacionamento do processo; 4) coloração em anilina azul descolorida a 1% em 0,1M de K_3PO_4 , por 4h; 5) esmagamento da amostra entre lâmina e lamínula de tal forma que toda a superfície do estigma pudesse ser visualizada e 6) observação sob microscópio provido de luz ultravioleta.

Foi realizada uma viagem ao Campo Experimental de Tracuateua, da EMBRAPA, com a finalidade de fazer o levantamento dos polinizadores locais, pois nesta região o bacurizeiro ocorre naturalmente em grandes aglomerados. Foi utilizada filmadora e máquina fotográfica para auxiliar na identificação dos visitantes.

Observou-se que a flor do bacurizeiro é grande, com cerca de 8cm de comprimento, terminal, perpendicular, cíclica, actinomorfa, hermafrodita e alógama (Fig. 4). O tipo de prefloração é imbricada; o gineceu é do tipo sincárpico; o ovário é súpero, pluricarpelar e plurilocular; o tipo de placentação é marginal-central; o tipo de óvulo é reto ou ortótrofo e a deiscência da antera é longitudinal. A coloração externa das pétalas é rosada, podendo ir de róseo claro a róseo intenso, o pólen é amarelo claro e o estigma é esverdeado. A flor apresenta numerosos estames coalescentes na base formando cinco feixes opostos às pétalas e estigma divididos em cinco lóbulos que ficam em um plano superior aos estames (Fig. 5) e oferta pólen e néctar em abundância. Os grãos de pólen estão envoltos em óleo, formando um aglomerado viscoso. Esta viscosidade do pólen impede sua dispersão pelo vento, tornando necessária a presença de um vetor biótico para efetuar o transporte do mesmo de um indivíduo para outro.

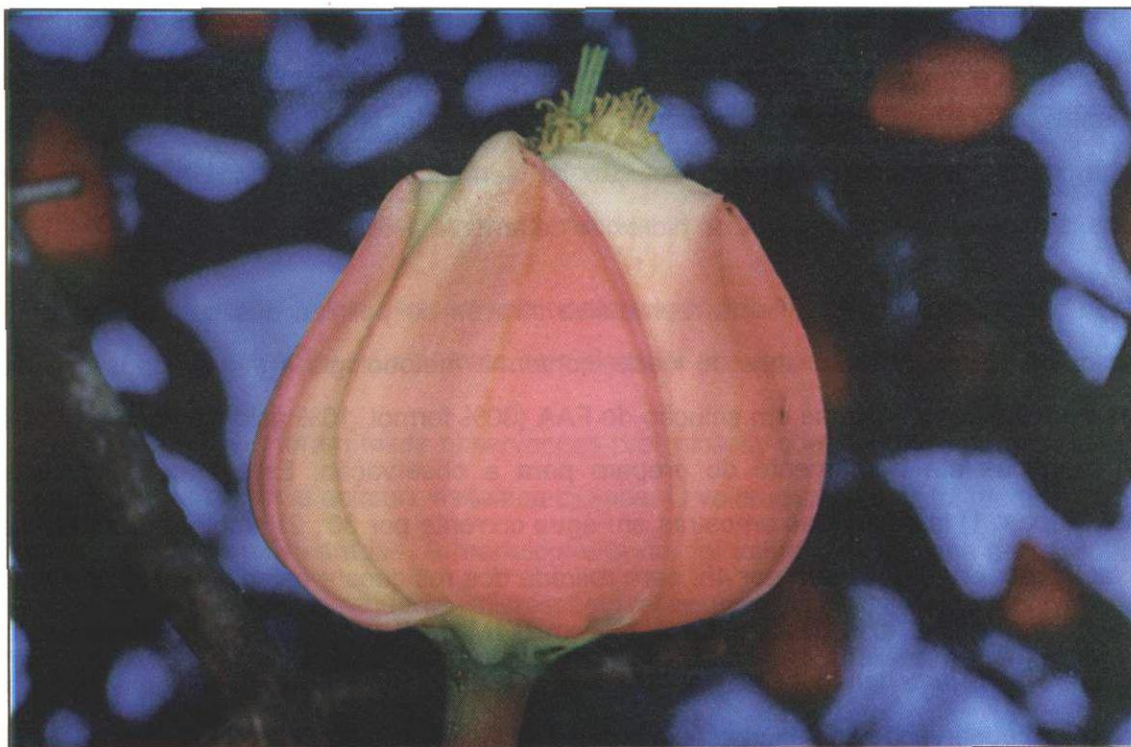


FIG. 4 - Flor de bacurizeiro (*Platonia insignis*), em Tracuateua, PA.



FIG. 5 - Flor de bacurizeiro (*Platonia insignis*) aberta evidenciando os órgãos reprodutivos, em Belém, PA.

As flores abrem-se ao amanhecer, por volta de 5:30h às 6:00h, ficando abertas o dia todo, até por volta de 22:00h às 23:00h, quando as pétalas começam a se desprender e cair.

O volume de néctar é grande, podendo atingir 3,1ml por flor, entretanto nas horas mais quentes do dia o volume diminui consideravelmente. Acredita-se que esta diminuição ocorre, em parte, devido à evaporação e também pela ação dos visitantes (vespas e pássaros), bastante elevada nestas horas. O grau Brix apresentou uma variação de 6,8% a 16,3% (Fig. 6), com os valores mais baixos no período da manhã, quando o volume de néctar era maior, aumentando o grau à medida que diminuía a quantidade de néctar. A média diária ficou em 10,8%.

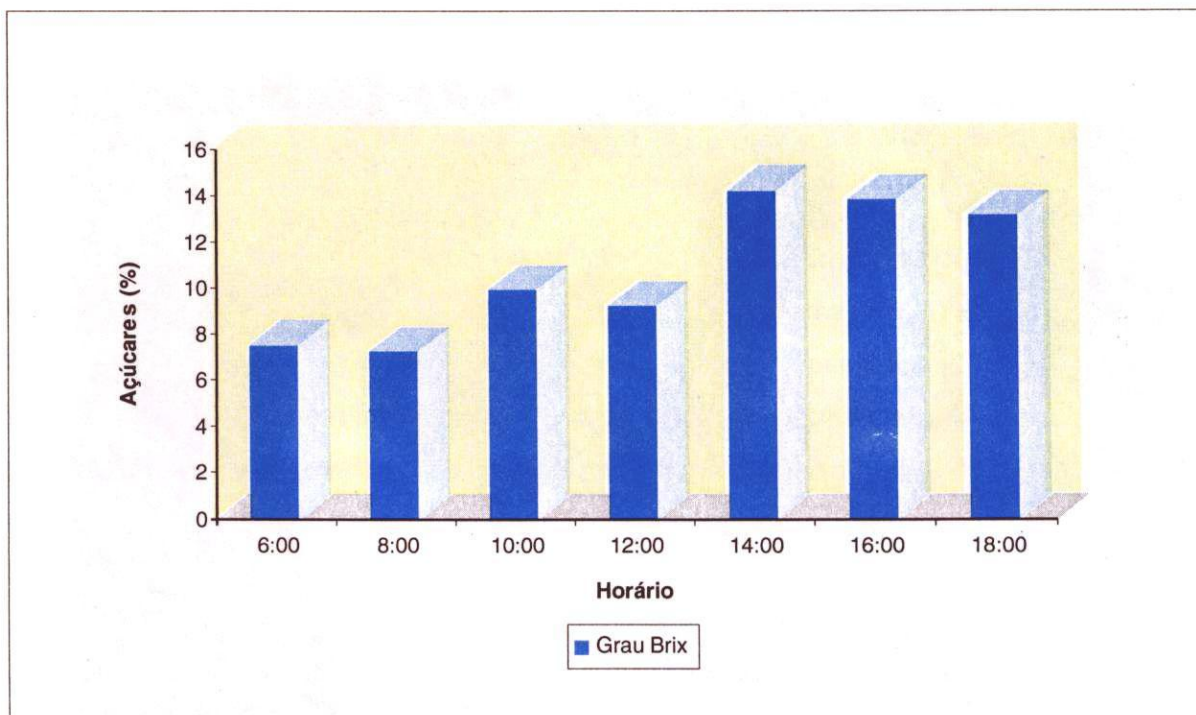


FIG. 6 - Variação do grau Brix no néctar de flores de bacurizeiro (*Platonia insignis*) em Belém, PA.

Verificou-se que o estigma fica bastante receptivo desde a antese até por volta das 16:00h, e depois diminui sua receptividade. A zona de maior receptividade está localizada no ápice dos lóbulos, que quando analisados sob microscópio, nota-se um orifício por onde os tubos polínicos penetram. Observou-se também a formação de bolhas no ponto central de convergência dos lóbulos, o que provavelmente seria decorrente da exposição de tecidos que sofreram alguma fissura no momento do afastamento dos mesmos, visto que permanecem unidos enquanto a flor está fechada e no início da antese. Os grãos de pólen permaneceram viáveis durante todo o dia.

Os testes sobre o sistema reprodutivo indicaram alogamia acentuada, não ocorrendo crescimento de tubo polínico no estigma de flores polinizadas com o próprio pólen (autoincompatibilidade esporofítica), conforme demonstraram os resultados expostos na Tabela 5, contudo, novos testes utilizando-se um maior número de amostras e indivíduos de uma mesma população e de populações distintas, deverão ser realizados para melhor elucidar o estudo da biologia floral desta espécie.

TABELA 5 - Resultado dos cruzamentos realizados entre três indivíduos enxertados de bacurizeiro (*Platonia insignis*), em Belém, PA.

Cruzamentos	Planta A _m	Planta B _m	Planta C _m
Planta A _f	*----	-----	**---
Planta B _f	-----	-----	**---
Planta C _f	***--	***--	-----

(*) presença de tubo polínico, (-) ausência de tubo polínico,
(m) doadora de grãos de pólen e (f) receptora de grãos de pólen

O teste para detectar osmóforos indicou que estes estão presentes principalmente na borda e face externa das pétalas e em toda extensão do estilete. Em reação com vapores de hidróxido de amônia, a flor assumiu uma coloração amarelo-esverdeada, evidenciando a presença de flavonol como pigmento.

Os visitantes encontrados constituíram dois grupos distintos, insetos e pássaros (Tabela 6). Dentre os insetos, foram encontradas seis espécies de vespas, *Polistes infuscatus*, *Polistes carnifex*, *Synoeca surinama*, *S. virginea*, *Polybia striata* e *P. rejecta*, que visitam a flor ao longo do dia, com uma frequência mais elevada no período de 12:00h às 12:30h (Fig. 7), pousando pelo lado externo das pétalas para sugar o néctar. A espécie predominante foi *Polistes infuscatus* com 53% de frequência (Figs 8 e 9). Abelhas das espécies *Trigona fulviventris*, *T. pallens* e *T. branneri* apresentaram o mesmo comportamento das vespas, além de provocar pequenos ferimentos nas bordas e face externa das pétalas para a coleta de resina, contudo, seu horário de atividades é pela manhã. Foi constatada a presença de orifícios na base das pétalas de botões prestes a abrir, provavelmente feitos pelas *Trigona* para a pilhagem de néctar ou coleta de resina. Tripes e pequenos coleópteros foram coletados entre os estames, provavelmente alimentando-se de pólen. Alguns dípteros foram coletados.

TABELA 6 - Polinizadores efetivos e ocasionais de bacurizelro (*Platonia insignis*) no Estado do Pará.

Polinizadores efetivos	Polinizadores ocasionais ou visitantes
<u>Aves</u>	<u>Aves</u>
- Psittacidae	- Coerebidae
<i>Pionites leucogaster leucogaster</i>	<i>Cyanerpes caeruleus</i>
<i>Brotogeris chrysopterus tuipara</i>	- Icteridae
<i>Aratinga leucophtalmus leucophtalmus</i>	<i>Cacicus cela</i>
	- Thraupidae
	<i>Ramphocelus carbo carbo</i>
	<i>Thraupis episcopus episcopus</i>
	<i>Thraupis palmarum palmarum</i>
	<u>Insetos</u>
	- Vespoidea
	- Vespidae
	<i>Polistes infuscatus</i>
	<i>Polistes carnifex</i>
	<i>Synoeca surinama</i>
	<i>Synoeca virginea</i>
	<i>Polybia striata</i>
	<i>Polybia rejecta</i>
	- Apoidea
	Apidae (Meliponinae)
	<i>Trigona fulviventris</i>
	<i>Trigona pallens</i>
	<i>Trigona branneri</i>

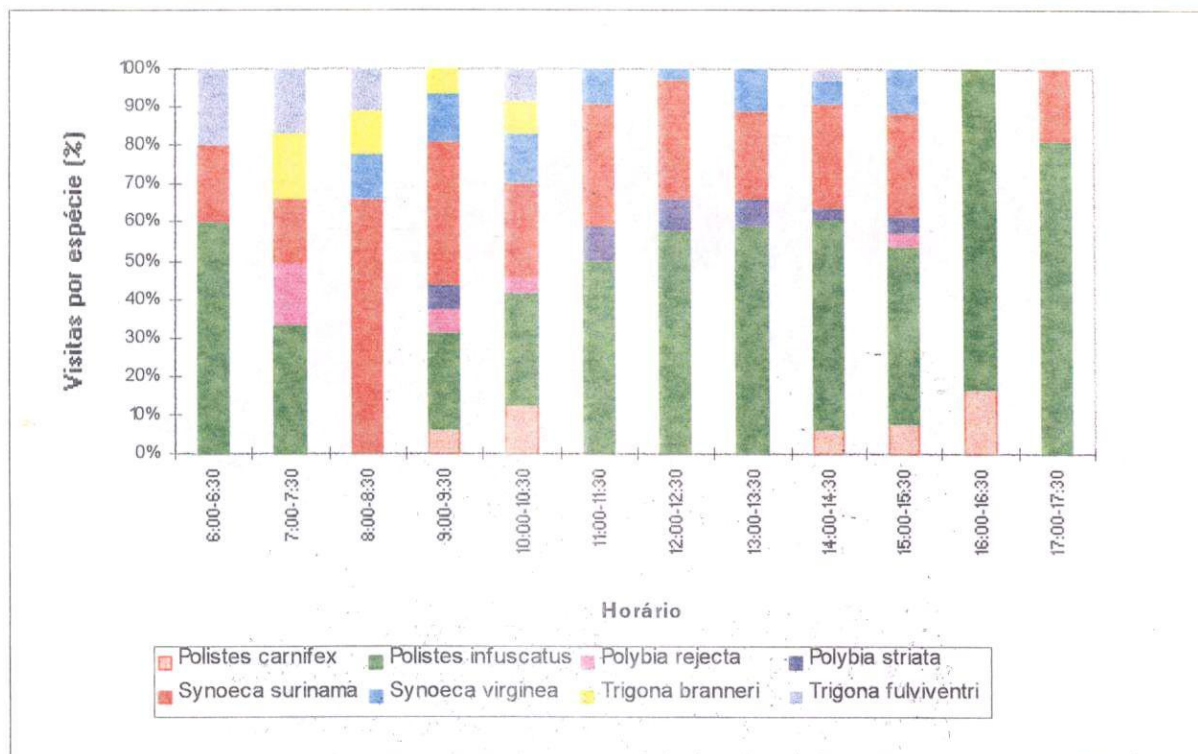


FIG. 7 - Frequência de insetos visitantes de flores de bacurizeiro (*Platonia insignis*) ao longo do dia, em Belém, PA.

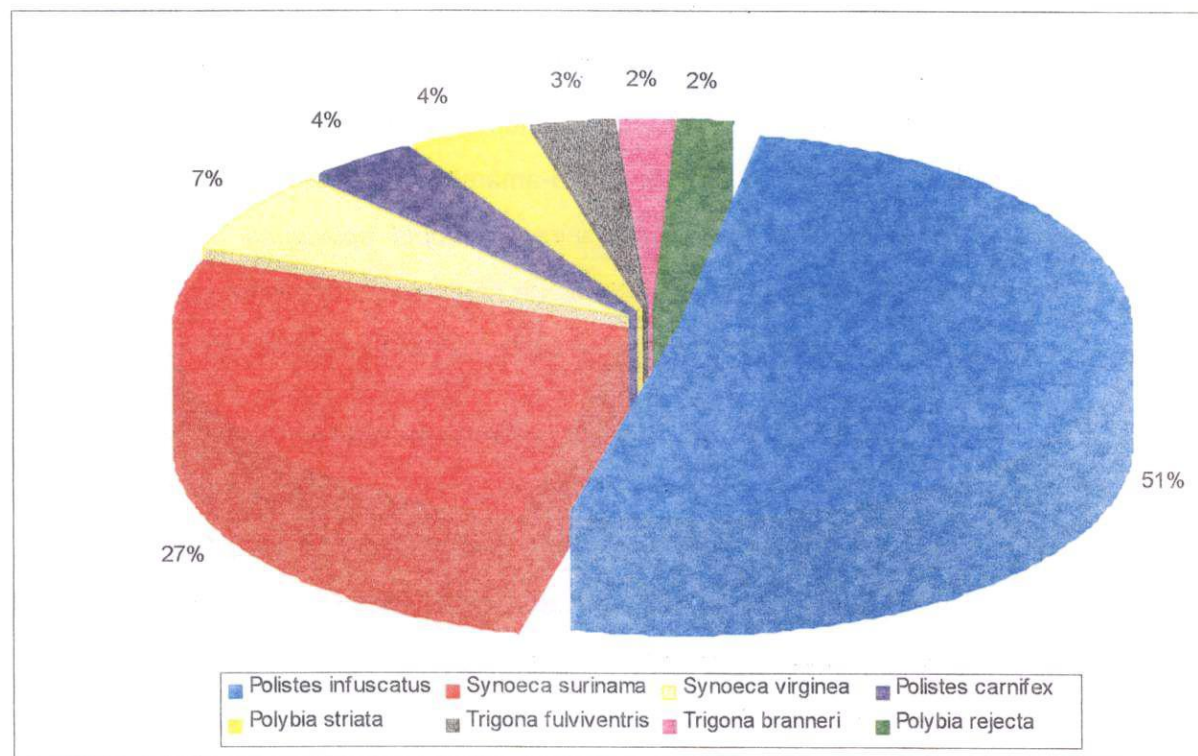


FIG. 8 - Frequência de ocorrência de vespas em flores de bacurizeiro (*Platonia insignis*), em Belém, PA.



FIG. 9 - *Polistes infuscatus* (Vespidae) coletando néctar em flor de bacurizeiro (*Platanus insignis*), em Belém, PA.

Os visitantes que mais se destacaram foram os pássaros das famílias Psittacidae (*Pionites leucogaster leucogaster*, *Brotogeris chrysopterus tuipara* (Fig. 10) e *Aratinga leucophthalmus leucophthalmus*-este encontrado em Tracuateua) comumente conhecidos por curicas e periquitos; Coerebidae (*Cyanerpes caeruleus* ou saí-de-perna-amarela); Icteridae (*Cacicus cela*, ou japiim) e Thraupidae (*Ramphocelus carbo carbo*, ou pípira, *Thraupis episcopus episcopus* e *Thraupis palmarum palmarum*, respectivamente sanhaço-azul e sanhaço-do-coqueiro) que chegam às flores logo após a antese, para se alimentar de pólen (no caso dos psitacídeos) e néctar.

Quanto ao comportamento dos psitacídeos, observou-se que estes pássaros geralmente voam em bandos com mais de dez indivíduos, e foram vistos em árvores de bacurizeiro nas regiões de Belém e Tracuateua. As visitas ocorreram pela manhã, entre 7:00h e 10:30h. Durante as visitas, os pássaros pousaram em um galho e passaram a alimentar-se de pólen e néctar. Depois de 20 a 30 minutos, o bando saía em revoada, retornando ou não após 30 - 60 minutos ao antigo local de forrageamento. Não foi observado psitacídeos de espécies diferentes em uma mesma árvore durante uma mesma visita. Observou-se territorialismo intra e interespecífico entre os icterídeos no momento em que estes alimentavam-se de néctar. Segundo relato de moradores da

região, a presença de periquitos em bacurizeiros em floração, é um evento muito comum, existindo a falsa idéia de que a queda das flores estaria condicionada à ação destes pássaros, o que não foi observado, pois, após a visita as flores permaneciam perfeitas.

Observando-se o comportamento dos visitantes, verificou-se que os insetos, apesar da elevada frequência nas flores, não atuam como polinizadores. Constatou-se que os psitacídeos realizam a polinização de maneira eficiente quando se alimentam de pólen e néctar, ao contrário dos demais visitantes que vão em busca apenas de néctar, pelo lado externo da flor, e não entram em contato com os órgãos reprodutivos. Após a visita destes pássaros, algumas flores foram coletadas e analisadas sob microscópio estereoscópio, onde foi constatada a presença de grãos de pólen aderidos ao ápice dos lóbulos do estigma, região de maior receptividade comprovada pelos testes com peróxido de hidrogênio. Assim, o bacurizeiro demonstrou ter uma síndrome de polinização ornitófila. A ornitofilia, ou seja, a polinização realizada por pássaros, é um fenômeno tipicamente tropical, ocorrendo nas Américas, Austrália, Ásia tropical e parte da África. A Europa não possui plantas polinizadas por pássaros, sendo esta a razão deste processo ter sido ignorado por autores clássicos.



FIG. 10 - *Brotogeris chrysopterus tuipara* (Psittaciade), principal polinizador de bacurizeiro (*Platonia insignis*) na região de Belém, PA.

Apesar da grande abundância de néctar e disponibilidade do mesmo durante todo o período diurno, foi pouco observada a presença de beija-flores, pássaros mais especializados em plantas que possuem na constituição de seu néctar maiores concentrações de açúcares (em geral acima de 20%) e de disacarídeo sacarose em relação às hexoses, glicose e frutose, estes dois últimos, mais comuns em flores procuradas por passeriformes. O néctar do bacurizeiro não foi analisado quanto aos diferentes açúcares que o compõem, contudo, com base no comportamento dos visitantes de suas flores, acredita-se que o mesmo poderá possuir maiores quantidades de frutose e glicose do que de sacarose. Estudos realizados afirmam que existem algumas diferenças entre as flores polinizadas por beija-flores e as polinizadas por outros pássaros. As primeiras geralmente posicionam-se horizontalmente ou pendentes, expondo os órgãos reprodutivos. O outro grupo, geralmente apresenta uma vara (poleiro) próximo às flores, e estas estão voltadas para cima, exatamente como ocorre com as flores do bacurizeiro.

A coloração avermelhada das flores do bacurizeiro constitui forte indicio de polinização ornitófila, pois os pássaros têm capacidade de enxergar esta cor, o que não acontece com a maioria dos insetos.

É importante mencionar que não há registros da atuação de psitacídeos como polinizadores de espécies vegetais neotropicais.

Experimento 3 - Ecologia da polinização do cupuaçuzeiro (*Theobroma grandiflorum*)

Estudos sobre a biologia floral de cupuaçuzeiro (*Theobroma grandiflorum* Schum - *Sterculiaceae*) indicaram que a baixa produtividade desta planta pode ser melhorada através do incremento da polinização natural ou artificial.

A partir de 1993 foram feitas observações sobre os insetos que visitavam as flores do cupuaçuzeiro, em duas áreas distintas: A - Campo Experimental da EMBRAPA-CPATU, em Belém, PA, em plantio consorciado com pupunha (*Bactris gasipaes*), ingá (*Inga edulis*) e açaí (*Euterpe oleracea*); B - plantios comerciais de cupuaçuzeiro no município de Tomé-Açu. Em ambas as áreas foram realizadas coletas e observações sobre o comportamento dos insetos que visitavam as flores

do cupuaçuzeiro, observando-se a morfologia externa dos visitantes usada para coleta e transporte de pólen, horário de visita às flores e recurso floral coletado. O comportamento dos insetos nas flores foi registrado através de fotografias, o que permitiu separar os insetos que contribuíam para a polinização, daqueles considerados prejudiciais às flores.

Parte dos insetos visitantes foram identificados no Laboratório de Entomologia da EMBRAPA-CPATU e parte foi enviada para especialistas na Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto - USP e da Universidade Federal do Maranhão. Alguns espécimes foram introduzidos na coleção entomológica do CPATU.

Além dos insetos visitantes foram coletadas flores de cupuaçuzeiro em vários estádios de desenvolvimento que estavam sendo danificadas por larvas de insetos, tendo sido criadas no laboratório até a emergência dos adultos.

Observou-se que a flor do cupuaçuzeiro é pequena, hermafrodita, alógama, oferta pólen e néctar e tem aroma de amêndoas. A antese pode iniciar a qualquer hora do dia, porém, geralmente só é completada a partir do meio dia. A maioria das flores abrem entre 15:00h e 16:00h (Fig. 11), entretanto em plantio situado em Tomé-Açu, a antese ocorre a partir das 7:30h. As flores permanecem abertas durante a noite, e quando não são fecundadas, caem no terceiro dia. Sua coloração é muito atrativa, pois contrasta o marfim das cógulas com o vinho das sépalas e estaminódios (Fig. 12). Essas cores alteram-se quando a flor entra em senescência. O período de receptividade do estigma compreende-se desde a abertura até por volta das 10:00h do dia seguinte.



FIG. 11 - Botão floral de cupuaçuzeiro (*Theobroma grandiflorum*) iniciando antese em Belém, PA.



FIG. 12 - Flor de cupuaçuzeiro (*Theobroma grandiflorum*) em Belém, PA.

As características morfológicas e o horário de abertura das flores indicam que a síndrome de polinização é entomófila, podendo ser melitófila ou cantarófila.

Dentre os principais insetos visitantes, destacaram-se as abelhas sem ferrão, das espécies *Trigona fulviventris*, *Plebeia minima* e *Trigonisca sp.* e pequenos besouros, um Curculionidae do gênero *Baris* e um Carabidae não identificado, além de outros microcoleópteros.

As abelhas encontradas são diminutas, de 2mm a 5mm, e pertencem à subfamília Meliponinae. Têm como característica a formação de colônias perenes em cavidades preexistentes em ocos de árvores, cipós ou em tijolos dentro de paredes. Estas abelhas têm uma frequência de visitas muito baixa, sendo encontradas no período das 7:30h às 10:30h e das 15:30h às 18:00h. Seu comportamento nas flores é compatível com a função de polinizadores, pois coletam pólen, ficando com o corpo todo recoberto e voam para outras flores, transportando o pólen de uma planta para outra (Tabela 7).

TABELA 7 - Polinizadores efetivos e ocasionais do cupuaçuzeiro no Estado do Pará.

Polinizadores efetivos		Polinizadores ocasionais	
Família	Espécie	Família	Espécie
Apidae	<i>Plebeia minima</i>	Curculionidae	<i>Baris</i> sp.
Apidae	<i>Trigona fulviventris</i>	Chrysomelidae	Não identificado
Apidae	<i>Trigonisca sp.</i>	Carabidae	Não identificado

Os coleópteros encontrados nas flores estavam com o corpo recoberto de pólen, porém sua função na flor corresponde a polinizadores eventuais. Alguns destes insetos estão sendo investigados com mais detalhes, especialmente sobre o ciclo de vida e a possível criação em laboratório.

Foi observado elevado Índice de queda de botões florais em cupuaçuzeiros de plantios comerciais em Belém e, principalmente, em Tomé-Açu. Este fato está relacionado ao ataque de pragas, pois estes botões apresentavam pontos necrosados que indicavam a ocorrência de postura. Por este motivo foram coletados botões caídos no solo, em plantio da EMBRAPA-CPATU,

que foram levados ao laboratório e colocados em recipientes de vidro para aguardar a emergência do adulto. Deste material, nasceram oito coleópteros (*Baris* sp.) e um lepidóptero (mariposa).

Em viagens realizadas a Tomé-Açu, outros botões com pontos necrosados foram coletados em três propriedades e conduzidos para Belém. Foi dissecado um determinado número de botões, e as larvas encontradas foram contadas, e separadas as larvas de coleópteros e das de dípteros. Observou-se maior incidência de larvas de dípteros nos botões. As larvas de dípteros encontradas foram dispostas em placas de petri com uma camada de areia lavada. As larvas de coleópteros foram cuidadosamente devolvidas aos botões florais e estes foram também dispostos em placas de petri com areia. Grupos de botões com quatro tamanhos diferentes (estádios de desenvolvimento) foram colocados em recipientes de plástico com uma base de papel toalha umedecido e em placas de petri com areia. Após dez dias, alguns adultos de dípteros começaram a emergir e alguns exemplares foram enviados a especialistas para identificação. Poucos adultos do gênero *Baris* foram encontrados. Na Tabela 8 estão relacionados os insetos encontrados danificando os botões florais do cupuaçuzeiro e os danos causados.

TABELA 8 - Principais danos provocados em botões de cupuaçuzeiro, em Belém e Tomé-Açu, PA.

Insetos	Espécie	Danos causados
Diptera	Espécie 1	Imaturos desenvolvem-se no interior dos botões, alimentando-se de partes florais. O botão fica flácido, com líquido armazenado, depois seca, mas não se desprende da árvore.
Diptera	Espécie 2	Idem
Diptera	Espécie 3	Idem
Curculionidae	<i>Baris</i> sp.	Apenas um imaturo se desenvolve no interior dos botões, alimentando-se de partes florais. O botão seca e cai ao solo.

Experimento 4 - Ecologia da polinização da castanheira-do-brasil (*Bertholletia excelsa*)

A castanheira (*Bertholletia excelsa* H.B.K., *Lecythidaceae*) destaca-se como uma das plantas mais nobres e valiosas da floresta amazônica. Entretanto, sabe-se que a relação entre a floração e a frutificação na castanheira é baixíssima, cerca de 0,4%.

A partir de 1994 foram iniciadas observações sobre a ecologia da polinização desta planta. Foram selecionados cinco indivíduos de castanheira precoce em um plantio com quinze anos de idade, situado na área experimental da EMBRAPA-CPATU.

A partir de março de 1994 foram realizadas observações fenológicas quinzenais de ordem qualitativa e sobre a ocorrência, duração e frequência dos seguintes eventos: floração (botão floral e flor); frutificação (fruto verde, maduro, sem semente e disseminação) e mudança foliar (folha nova e madura, desfolha parcial e total). Associados às variáveis de eventos reprodutivos, foram levados em consideração dados meteorológicos (precipitação pluviométrica, temperatura do ar, umidade relativa do ar e insolação) obtidos na Estação Meteorológica da EMBRAPA-CPATU.

Durante o período de floração, foram coletados os insetos visitantes das flores, observando-se o comportamento nas flores para determinar sua importância no processo de polinização.

Foram conduzidas observações sobre a biologia floral, tais como morfologia floral, detecção de osmóforos, contagem de óvulos, estames e grãos de pólen (utilizando lâmina Neubauer - hemacitômetro), número de flores abertas/dia em inflorescências. Foi fotografada a superfície de estigmas visitados e não-visitados por polinizadores com Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV), visando observar a importância destes agentes na polinização.

Estes procedimentos estão sendo realizados com o auxílio de uma torre metálica de 10m de altura instalada no plantio da EMBRAPA-CPATU. Foram realizadas viagens aos municípios de Capitão-Poço e Marabá para coleta de dados sobre a polinização.

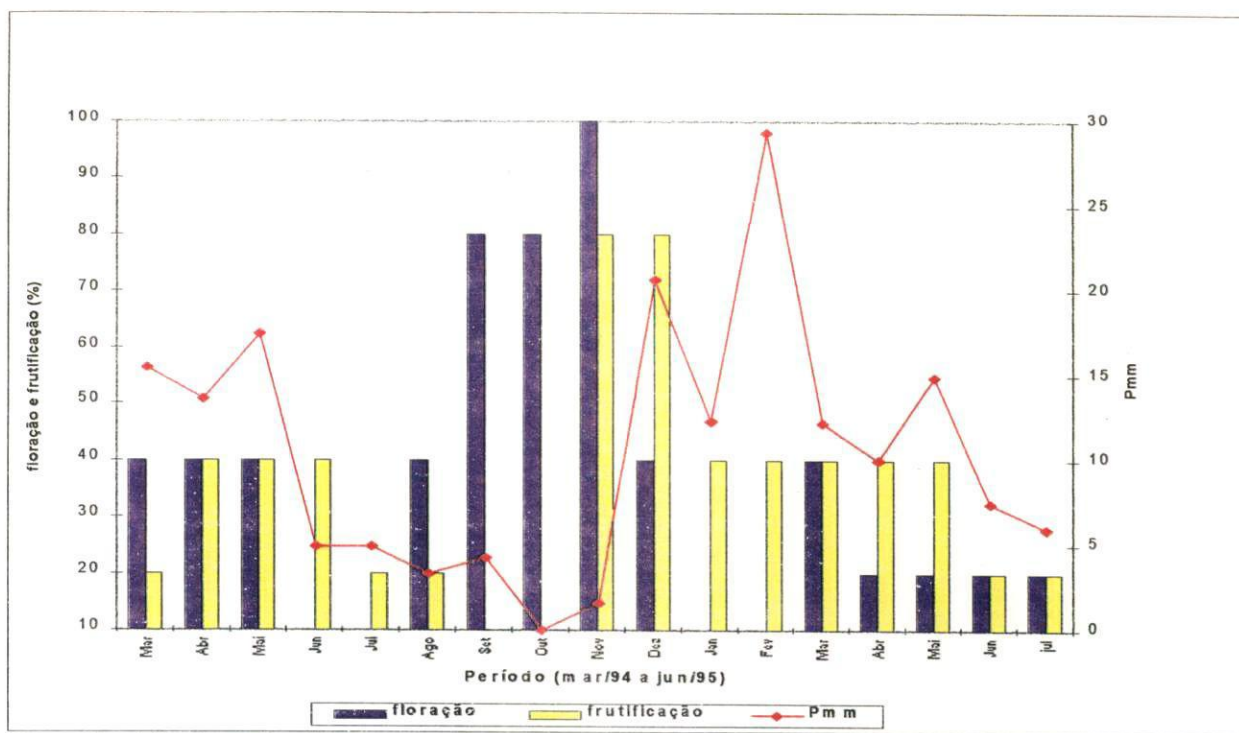
Os dados de fenologia coletados até o momento consistiram em período de mudança foliar, surgimento de botões, floração e frutificação (Tabela 9). Dentre as plantas selecionadas, as de números 1 e 2 apresentaram a fenofase de floração mais pronunciada nos meses de março a junho,

coincidindo com o período chuvoso, entretanto houve também floração nos meses de agosto a novembro. As plantas 3, 4 e 5 manifestaram a fenofase de floração no período menos chuvoso, ou seja, nos meses de setembro a dezembro (Fig. 13). A fenofase de frutificação variou de acordo com cada indivíduo. Na fenofase de mudança foliar o surgimento de folhas novas precediu o aparecimento de botões florais (Fig. 14). Alguns indivíduos apresentaram desfolha total. Observou-se ocorrência de variações intra-específicas quanto à fenologia reprodutiva dos indivíduos estudados, assim, a partir de janeiro de 1995, foram acrescentados mais três indivíduos de castanheira para os estudos de fenologia. Na Fig.15 estão os dados meteorológicos coletados na Estação Meteorológica da EMBRAPA-CPATU, no período de março de 1994 a junho de 1995.

TABELA 9 - Dados fenológicos de floração, frutificação e mudança foliar em cinco plantas selecionadas de *Bertholletia excelsa*, em Belém, PA, no período de março de 1994 a julho de 1995.

Indivíduos	1 9 9 4												1 9 9 5																							
	M	M	A	A	M	M	J	J	J	J	A	A	S	S	O	O	N	N	D	D	J	J	F	F	M	M	A	A	M	M	J	J	J	J		
1	b	b	b								b	b	b				b	b	b					b	b											
	f	f	f	f	f						f	f					f	f	f					f												
	n	n	n	n	m	m	N	N	N	N	n	n	n	n	n	n	m	m	m	m	m	N	N	N	N	N	n	n	m	m	m	m	m	m	m	
2	b	b									b	b	b	b	b		b	b	b					b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b		
	f	f	f	f	f						f	f					f							f	f		f	f	f	f	f	f	f	f		
	N	N	n	n	m	m	N	N	N	N	n	n	n	n	n	n	n	m	m	m	m	m	m	N	N	N	n	n	n	n	n	n	n	m	m	
3																	b	b	b	b																
	n	n	m	m	m	m	m	m	m	m	m	m	P	P	n	n	n	n	m	m	m	m	m	m	m	m	m	m	m	m	m	m	m	m	m	
4																	b	b	b	b	b															
	v	v	v	v	v	v	M	M																												
	m	m	m	m	m	m	P	T	N	N	n	n	n	n	n	n	m	m	m	m	m	m	m	m	m	m	m	m	m	m	m	m	P	P	T	N
5																	b	b	b	b	b															
	m	m	m	m	m	m	m	m	P	T	N	n	n	n	n	n	m	m	m	m	m	m	m	m	m	m	m	m	m	m	m	P	T	N	n	

b = botão floral; f = floração; v = fruto verde; M = fruto maduro; N = folha nova aparecendo; n = copa completa com folha nova; m = copa completa com folha madura; P = desfolha parcial; T = desfolha total.

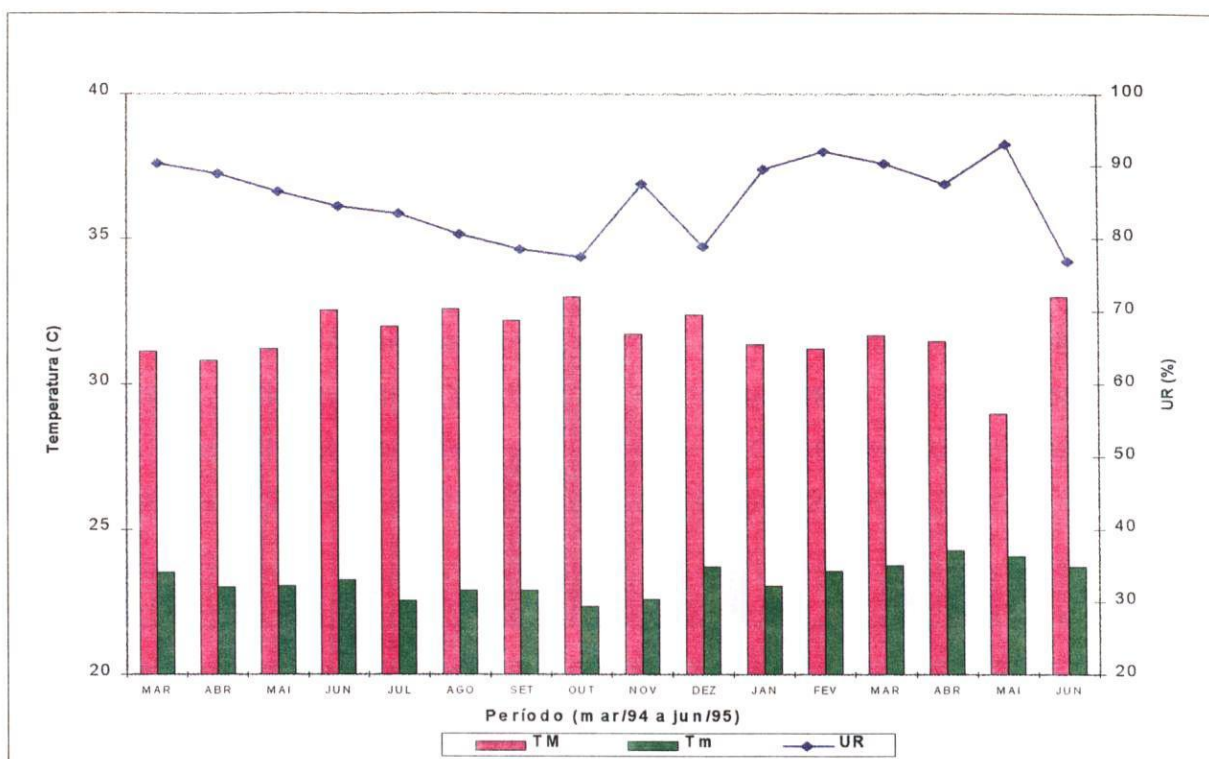


Pmm = Precipitação pluviométrica

FIG. 13 - Comportamento das fenofases de floração e frutificação da castanheira-do-brasil em relação a precipitação pluviométrica da área de estudo no período de março de 1994 a junho de 1995, em Belém, PA.



FIG. 14 - Ramo de castanheira-do-brasil (*Bertholletia excelsa*) lançando folhas novas, em Belém, PA.



TM = Temperatura Máxima; Tm = Temperatura mínima; UR = Umidade Relativa do ar

FIG. 15 - Dados meteorológicos de temperatura e umidade relativa do ar observados na Estação Meteorológica da EMBRAPA-CPATU no período do estudo.

Observou-se que a castanheira apresenta inflorescências com uma média de 0,76 (n=182) flores abertas por dia, em alguns casos até três flores foram encontradas, mas em geral apenas uma (Figs. 16 e 17). Estas flores abrem-se de madrugada, ao amanhecer, e possuem uma morfologia especial com pétalas aderidas em forma de chapéu, permitindo apenas que insetos grandes e fortes penetrem para coletar pólen ou néctar (Fig. 18). O teste para detecção de osmóforos indicou a concentração das glândulas de cheiro na parte interna da flor. Como recurso floral foram encontrados néctar e pólen. A contagem de óvulos revelou que existem flores com quatro ou cinco lóculos, sempre apresentando cinco óvulos por lóculo, assim foram encontrados 20 ou 25 óvulos nas flores analisadas. O número médio de estames foi de $90,3 \pm 6,7$, o número médio de grãos de pólen foi de 601.993,98 e a razão pólen/óvulo foi de 26.755,29.



FIG. 16 - Aspecto geral da floração da castanheira-do-brasil (*Bertholletia excelsa*), em Belém, PA.



FIG. 17 - Flor de castanheira-do-brasil (*Bertholletia excelsa*), em Belém, PA.



FIG. 18 - Abelha (*Xylocopa frontalis*) penetrando na flor da castanheira-do-brasil (*Bertholletia excelsa*), em Belém, PA.

O material analisado com MEV demonstrou acentuada diferença na quantidade de grãos de pólen presentes na superfície dos estigmas de flores visitadas e não-visitadas. A superfície do estigma da castanheira possui estruturas semelhantes a papilas que facilitam a aderência do pólen. Observou-se que as flores não-visitadas apresentavam pequena quantidade de pólen aderido, enquanto que nas flores visitadas, esta quantidade era visivelmente superior, recobrendo quase que totalmente a superfície estigmática. Foi possível observar ainda o crescimento de tubo polínico em alguns grãos de pólen.

Observou-se que a atividade de insetos visitantes é mais elevada imediatamente após a antese até cerca de 7:00h, porém o período de visitas pode estender-se até às 11:00h. Dentre os visitantes foram encontradas abelhas de grande porte das famílias Apidae (*Bombus brevivillus*, *Bombus transversalis*, *Eulaema* sp.) e Anthophoridae (*Xylocopa frontalis*, *Centris* sp., *Epicharis rustica*, *Epicharis* (*Hoplepicharis*) *affinis*). Algumas abelhas foram coletadas e enviadas para identificação na Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto/USP (Tabela 10).

TABELA 10 - Polinizadores de castanha-do-brasil no Estado do Pará, região de Belém.

Família	Espécie
Anthophoridae	<i>Xylocopa frontalis</i>
Anthophoridae	<i>Xylocopa aurulenta</i>
Anthophoridae	<i>Epicharis rustica</i>
Anthophoridae	<i>Epicharis (Hoplepicharis) affinis</i>
Anthophoridae	sp .1 (não identificado)
Apidae	<i>Bombus brevivillus</i>
Apidae	<i>Bombus transversalis</i>
Apidae	<i>Eulaema</i> sp.

Conclusões preliminares

Experimento 1:

Em termos de "recompensa", a flor do urucuzeiro somente oferece pólen aos seus visitantes, o que é uma das características das flores polinizadas por vibração. O pólen do urucuzeiro é classificado como atrativo primário, muito utilizado na alimentação de larvas de abelhas.

Certos atributos apresentados pelas flores do urucuzeiro são típicos de flores polinizadas por abelhas, como por exemplo a coloração, o horário da antese, o recurso ofertado e o aroma. Outras características florais como simetria radial, contraste de cor, reflexão de ultravioleta e antera de deiscência poricida, são encontrados em flores polinizadas por vibração.

Foi comprovado que os insetos visitantes das flores do urucuzeiro são basicamente abelhas vibradoras, das famílias Apidae e Anthophoridae. Assim, o urucuzeiro é uma planta que apresenta autogamia e alogamia, porém sua produtividade é superior quando polinizada por um grupo de abelhas vibradoras, sendo que *Xylocopa frontalis* e *Epicharis rustica* são as mais

importantes. Não foi detectada ineficiência e/ou escassez de polinizadores na área estudada, entretanto recomenda-se a quem for plantar urucuzeiro, deixar área de mata ou capoeira próximo ao plantio, para assegurar a presença das abelhas. Assim, não será necessário desenvolver programas de criação e manejo dos polinizadores.

Experimento 2:

Como "recompensa", as flores do bacurizeiro oferecem aos visitantes néctar e pólen em abundância, o que atrai grande diversidade de animais.

Características como néctar em grande quantidade e com baixa concentração de açúcares; pólen viscoso e abundante; flor grande com estruturas robustas e esclerosadas; cor viva e atraente, geralmente escarlate ou avermelhada; ausência de cheiro e guias de nectários e período diurno de disponibilidade dos recursos, indicam que a polinização é realizada por pássaros.

Foram encontrados pássaros polinizando as flores de bacurizeiro, destacando-se os periquitos, fato inédito dentre os estudos de ecologia da polinização de plantas amazônicas.

O bacurizeiro é uma planta alógama, com síndrome de polinização ornitófila, onde os principais agentes polinizadores no nordeste do Estado do Pará, pertencem à família Psittacidae (*Pionites leucogaster leucogaster*, *Brotogeris chrysopterus tuipara* e *Aratinga leucophthalmus leucophthalmus*). Em populações naturais foram encontrados indivíduos de bacurizeiro ocorrendo de maneira agrupada, estas concentrações provavelmente são formadas por árvores geneticamente semelhantes, já que esta espécie possui grande regeneração através de brotações radiculares. Os psitacídeos constituem-se excelentes polinizadores para esta planta, visto que possuem grande alcance de voo e desta forma podem efetuar a troca gênica entre populações distantes entre si.

No caso de plantações comerciais para a produção de frutos, deve se tomar cuidado para que não haja total uniformidade genética no plantio, como por exemplo, utilizar-se clones oriundos de um só indivíduo, ou até mesmo de uma só população, o que poderia provocar o insucesso do empreendimento, pois esta planta necessita de polinização cruzada. É também importante preservar áreas de mata ao redor do plantio, habitat natural dos polinizadores.

Experimento 3:

Estão sendo realizadas viagens ao interior do Estado do Pará, com a finalidade de localizar ninhos de *T. fulviventris*, *P. minima* e *Trigonisca*, para iniciar a criação destas abelhas em caixas de madeiras. Um ninho de *Trigonisca* foi coletado em Ananindeua e transferido para uma pequena caixa de madeira.

A baixa produtividade do cupuaçuzeiro pode melhorar com o incremento da polinização natural. É muito importante o desenvolvimento de programas de criação e manejo de polinizadores, utilizando-se as espécies de abelhas encontradas polinizando naturalmente as plantas estudadas. Para se comprovar a eficácia destes programas, serão realizados ensaios de polinização, distribuindo-se ninhos de abelhas dos gêneros *Plebeia* e *Trigonisca* em plantios comerciais. Será observada a resposta das plantas quanto à produtividade, medida através da quantidade e peso dos frutos, em relação à atuação dos polinizadores.

Devido ao elevado Índice de queda dos botões florais, especialmente em áreas de produtores de Tomé-Açu, serão conduzidas investigações sobre as pragas encontradas, visando desenvolver medidas de controle.

Experimento 4:

A castanheira-do-brasil é uma planta alógama com síndrome de polinização melitófila. Os principais polinizadores no Estado do Pará são abelhas das famílias Apidae e Anthophoridae, destacando-se as espécies *Xylocopa frontalis*, *Epicharis rustica*, *E. affinis* e *Bombus brevivillus*. Está sendo realizado um levantamento de ninhos destas abelhas para se iniciar a criação das mesmas em laboratório. O desenvolvimento de programas de criação e manejo de polinizadores será imprescindível para a expansão do cultivo em larga escala desta planta.

Difusão de tecnologia

- Apresentação de palestra do trabalho Insetos relacionados à biologia floral do cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*), na CEPLAC, dia 25.11.92.

- Artigo publicado no jornal "Folha de São Paulo", caderno Agrofolha, com o título "EMBRAPA QUER PRESERVAR POLINIZADORES", dia 09.02.93.

- Apresentação de painéis dos trabalhos "Ecologia da polinização de urucu (*Bixa orellana*) em Belém, PA." e "Notas sobre a biologia reprodutiva de bacuri (*Platonia insignis*) em Belém, PA" no XLIV Congresso Nacional de Botânica, realizado em São Luís, MA, no período de 24 a 30.01.93.

- Apresentação de painel e exposição oral do trabalho "Aspectos da biologia reprodutiva de urucu (*Bixa orellana* L.) em Belém, PA" no III Seminário de Iniciação Científica da Faculdade de Ciências Agrárias do Pará, realizado em Belém, PA, em abril de 1993 e no XIII Congresso Brasileiro de Iniciação Científica em Ciências Agrárias, realizado em Areia, PB, de 31.10 a 06.11.93.

- Apresentação de painéis no Workshop "Geração de Tecnologia Agroindustrial para o Trópico Úmido". Convênio CPATU/JICA, em março de 1994: "Ecologia da polinização do urucu (*Bixa orellana*) em Belém, PA" e "Ecologia da polinização do bacuri (*Platonia insignis*) em Belém, PA".

- Apresentação de seminário sobre "A polinização de castanheira-do-brasil (*Bertholletia excelsa*)", com o consultor Dr. Jun Nakamura em dezembro de 1994.

- Apresentação de painel do trabalho "Ecologia da Polinização de urucuzeiro (*Bixa orellana* L.) em Belém - PA." no II Congresso Brasileiro de Corantes Naturais. II Simpósio Brasileiro de Urucu, realizado em Belém, PA, em setembro de 1994.

- Apresentação de painel e exposição oral do trabalho "Levantamento de animais visitantes de flores de bacurizeiro (*Platonia insignis*) em Belém, PA", no IV Seminário de Iniciação Científica da Faculdade de Ciências Agrárias do Pará, realizado em Belém, em setembro de 1994 e no II Congresso de Brasileiro de Ecologia, realizado em Londrina, em dezembro de 1994.

- Apresentação de painel e exposição oral do trabalho "Fenologia qualitativa de floração frutificação e mudança foliar em castanha-do-brasil (*Bertholletia excelsa*), Belém, PA", no V Seminário de Iniciação Científica da Faculdade de Ciências Agrárias do Pará, realizado em Belém, em setembro de 1995.

- Orientação a três bolsistas de Iniciação Científica do CNPq sobre metodologia de pesquisa em biologia floral, polinização e criação de abelhas.

- Atendimento ao público externo (estudantes, produtores, outros) e interno (pesquisadores).

VASSOURA-DE-BRUXA EM CUPUAÇUZEIRO

- BIOLOGIA E FISIOLOGIA DE PATÓGENO

- EPIDEMIOLOGIA

BIOLOGIA E FISILOGIA DE *Crinipellis pernicioso* DO CUPUAÇUZEIRO, EM RELAÇÃO À FISIOPATOLOGIA

Ruth Linda Benchimol Stein¹
Fernando Carneiro de Albuquerque¹
Olinto Gomes da Rocha Neto²
Heráclito Eugênio O. da Conceição¹
Nina Maradei Müller³
Ângela Maria Leite Nunes¹
Cleber Novaes Bastos⁴
Tadamitsu Endo⁵
Stutae Ito⁵

Resumo: Foram obtidas culturas monospóricas de isolados em Abaetetuba, Belém, Castanhal, Capitão Poço, Colares, Santo Antonio do Tauá e Tomé-Açu para estudos "in vitro". Não houve diferenças nos tamanhos de basidiocarpo e basidiospore entre os isolados de *Theobroma grandiflorum*, *T. cacao* e *T. subincanum*. A espécie *T. obovatum* apresentou menor basidiocarpo e maior basidiospore. Em 1992, houve produção de basidiocarpos em vassouras destacadas em todos os meses do ano, com aumento significativo a partir de maio e pico em julho. O maior número de vassouras emitidas por plantas no campo foi nos meses de julho e agosto e o menor em outubro de 1991. O comprimento médio da vassoura verde variou de 15,5cm a 50,5cm. As vassouras permaneceram verdes a partir da emissão por 5,9 a 10,4 semanas. O secamento ocorreu entre 0,9 e 1,1 semanas. A produção artificial de basidiosporos de *Crinipellis pernicioso* foi obtida no meio de farelo-vermiculita com produção média de 87 basidiocarpos infectivos. Devido às dificuldades encontradas no processo de inoculação do fungo ainda não foram iniciados os estudos fisiológicos sobre plantas infectadas com *C. pernicioso*.

¹ Eng. Agr. M.Sc. EMBRAPA - CPATU. Caixa Postal 48, CEP 66.017-970. Belém, PA.

² Eng. Agr. Ph.D. EMBRAPA - CPATU.

³ Eng. Agr. EMBRAPA - CPATU.

⁴ Pesquisador da CEPLAC - Rod. Augusto Montenegro, Km 7, Cx. Postal 1801, CEP 66.635-110. Belém, PA.

⁵ Consultor da Japan International Cooperation Agency - JICA. Av. Nazaré 272, Sala 105. Ed. Clube de Engenharia, CEP 66.035-170. Belém, PA.

BIOLOGY AND PHYSIOLOGY OF *Crinipelis perniciosa* ON CUPUAÇU PLANTS, IN TERMS OF ITS PHYSIOPATHOLOGY

Abstract: The objective of the study developed with *C. perniciosa* on cupuaçu plants is to study the biology of this pathogen, as well as the alterations it induces in the plants with symptoms of witches' broom compared with healthy plants. Isolated monosporic cultures were obtained in Abaetetuba, Belém, Castanhal, Capitão Poço, Colares, Santo Antonio do Tauá and Tomé-Açu for "in vitro" studies. There was no difference in size of the basidiocarp and basidiospores among those isolated of *T. grandiflorum*, *T. cacao*, *T. subincanum*. The specie *T. obovatum* presented the smallest basidiocarp and largest basidiospore. In 1992, there was basidiocarp production in attacked throughout the year, rising sharply in March and peaking in June. The highest number of brooms emitted by plants in the field was in the months of July and August, and the lowest in October (1991). The average length of the green brooms varied from 15.5 to 50.5 cm. The brooms remained green for 5.9 to 10.4 weeks after sprouting. Drying occurred from 0.9 to 1.1 weeks. Artificial production of *C. perniciosa* was obtained in a medium of bran-vermiculite with an average production of 87 basidiocarps, all of which were infective. Due to difficulties encountered in the inoculation process of the fungus, to present we have not been able to begin the physiological studies on plants infected with *C. perniciosa*.

Objetivo

Os trabalhos desenvolvidos com *C. perniciosa* do cupuaçuzeiro têm como objetivo estudar a biologia desse patógeno e as alterações por ele provocadas nas plantas com sintomas de vassoura-de-bruxa, em relação a plantas sadias.

Justificativa

O cupuaçuzeiro (*T. grandiflorum* Schum.) é uma planta nativa da região amazônica que produz frutos com aroma e sabor muito apreciados para o consumo “in natura” e fins industriais. A crescente utilização do cupuaçu pela indústria tem despertado o interesse pelo plantio racional desta cultura.

O cupuaçuzeiro, tanto na fase jovem como na adulta, sofre o ataque de fitopatógenos que prejudicam o desenvolvimento e a produção da cultura, sendo a vassoura-de-bruxa (*C. perniciosa*) uma das mais prejudiciais, visto que ataca os tecidos meristemáticos em desenvolvimento, afetando o vigor, a floração e a frutificação da planta. Apesar de bem estudado na cultura de cacaueteiro, onde causa a mesma doença, pouco se sabe sobre a biologia e fisiologia desse patógeno no cupuaçuzeiro, bem como os impactos por ele causados na fisiologia do hospedeiro durante as diferentes fases de crescimento.

Estudos com a cultura de cacaueteiro indicam que existe grande variabilidade na espécie *C. perniciosa* e que, em condições normais, os isolados do cacaueteiro não atacam o cupuaçuzeiro, e vice-versa. Portanto, é necessário um estudo detalhado sobre a biologia e fisiologia do isolado que ataca o cupuaçuzeiro, bem como as alterações sofridas pela planta hospedeira mediante o ataque do patógeno, visando o embasamento para futuros estudos sobre as medidas de controle a serem adotadas contra a doença.

Resultados parciais

Vassouras coletadas em plantios de cupuaçuzeiro localizados em diferentes municípios do Pará, como Abaetetuba (Ab), Belém (Tg; H2), Castanhal (C), Capitão Poço (CP), Colares (Col), Santo Antônio do Tauá (SAT) e Tomé-Açu (TA), foram mantidas em condições de telado semi-sombreado, para induzir à produção de basidiocarpos e basidiosporos, para o estudo da biologia e fisiologia de *C. perniciosa*, bem como das alterações por ele provocadas ao atacar o cupuaçuzeiro. Vassouras de *T. cacao* (Tca), *T. subincanum* (Tsb) e *T. obovatum* (Tob) também foram coletadas em Belém, para comparações.

Experimento 1 - Caracterização morfológica de *Crinipellis perniciosa* de *Theobroma* spp.

O tamanho dos basidiocarpos e basidiosporos de *C. perniciosa* foi medido, com o objetivo de detectar diferenças entre os isolados de *Theobroma* spp. Em relação ao tamanho do basidiocarpo, observou-se que o diâmetro do píleo variou entre 4,81mm e 11,60mm e o comprimento do estipe, entre 2,20mm e 4,80mm (Tabela 11). Os basidiosporos de *C. perniciosa* são elipsóides (Fig. 19), com comprimento variando entre 5,40 μ e 7,97 μ e largura variando entre 10,11 μ e 10,96 μ (Tabela 12).

TABELA 11 - Variabilidade de isolados de *Crinipellis perniciosa* de *Theobroma* spp., em relação ao tamanho de basidiocarpos.

Isolado	Ø do Píleo	Comprimento do Estipe (mm)
C 990	9,20	4,30
C 392	8,10	3,83
CP 191	9,30	4,10
CP 491	8,90	3,80
CP 292	8,22	3,90
H2 1090	11,60	4,60
H2 491	10,00	4,70
H2 1091	8,56	4,31
H2 292	9,06	3,85
SAT 191	8,80	4,40
SAT 292	8,43	3,87
TA 491	7,71	3,62
TA 292	8,26	3,61
Tca 591	6,30	3,50
Tca 292	7,90	4,80
Tca 492	9,00	4,33
Tob 292	4,81	2,20
Tsb 191	8,30	3,60
Tsb 491	7,60	2,50
Tsb 1191	8,46	3,79
Tsb 292	8,30	3,16

Média de 50 observações/isolado.

C = Castanhal; CP = Capitão Poço; H2 = Belém; SAT = Santo Antônio do Tauá; TA = Tomé-Açu; Tca = *T. cacao*; Tob = *T. obovatum*; Tsb = *T. subincanum*.

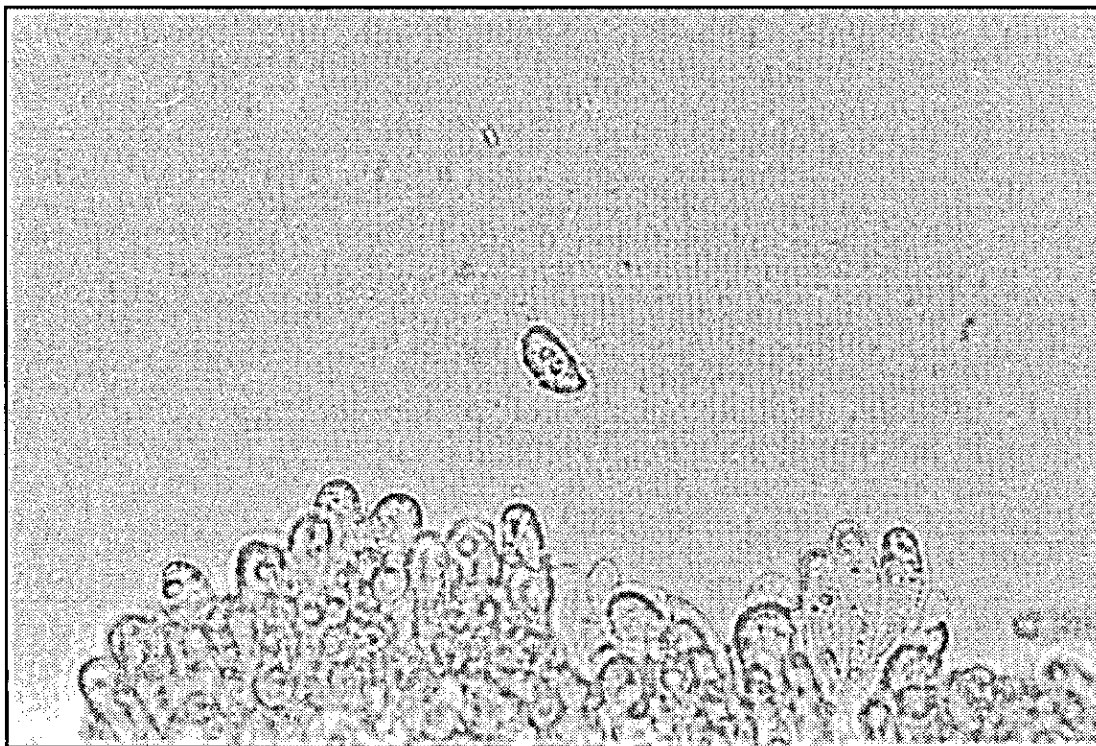


FIG. 19 - Basídias e basidiospóro de *Crinipellis pernicioso* do cupuaçuzeiro, vistos através de microscopia ótica.

TABELA 12 - Tamanho de basidiosporos de *Crinipellis pernicioso* de *Theobroma* spp.

Isolado	Largura (μ)	Comprimento (μ)
C 392	5,66	10,40
CP 292	5,54	10,53
SAT 292	5,46	10,40
TA 292	5,78	10,80
TA 491	5,58	10,35
Tob 292	7,97	10,96
Tsb 1191	5,59	10,11
Tsb 292	5,91	10,33

Média de 50 observações/isolado (Objetiva 40x; Fator = 4,8).

C = Castanhal; CP = Capitão Poço; SAT = Santo Antônio do Tauá; TA = Tomé-Açu; Tob = *T. obovatum*; Tsb = *T. subincanum*.

Experimento 2 - Comparação morfológica entre isolados de *Crinipellis perniciosa* de *Theobroma* spp.

Colônias de isolados de *C. perniciosa* de *Theobroma* spp. foram caracterizadas em meio de batata-dextrose-ágar (BDA) quanto ao aspecto morfológico. O crescimento em diâmetro também foi observado, em regime de escuro contínuo a $25^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$, durante 21 dias (Tabela 13).

TABELA 13 - Comparação morfológica entre isolados de *Crinipellis perniciosa* de *Theobroma* spp.

Parâmetro	Tg ₁	Tca	Tsb	Tob	Tg ₂
	491	1090	191	491	191
1	7,95	9,00	6,90	9,00	4,60
2	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
3	Hialina	Hialina	Hialina	Hialina	Branca
4	Circular	Circular	Circular	Circular	Circular
5	Esparsa	Esparsa	Esparsa	Encrespada	Densa aérea
6	Regular	Regular	Irregular	Regular	Irregular
7	+	+	+	++	+++

1 - Diâmetro médio da colônia (cm); 2 - Pigmento carmin: presente ou ausente; 3 - Cor da colônia: opaca; hialina; sinais vermelhos; 4 - Feitio da colônia: circular; concêntrica; estrelada; 5 - Aspecto da colônia: regular; densa; encrespada aérea; molhada submersa; esparsa; irregular submersa; 6 - Borda da colônia: regular; irregular; 7 - Textura do micélio: muito escasso(+); abundante e frouxo(++); abundante e compacto(+++).

Tg₁ = *T. grandiflorum*, isolado de Tomé-Açu; Tca = *T. cacao*; Tsb = *T. subincanum*; Tob = *T. obovatum*; Tg₂ = *T. grandiflorum*, isolado de Santo Antônio do Tauá

Experimento 3 - Compatibilidade somática entre isolados de *Crinipellis perniciosa* de *Theobroma* spp.

Isolados de *C. perniciosa* de *Theobroma* spp. foram pareados em meio de cultura V-8, com o objetivo de observar a compatibilidade entre os micélios. As culturas pareadas foram incubadas por 21 dias em escuro contínuo, a 27°C (Tabela 14). Os micélios de *C. perniciosa* de cupuaçuzeiro e de cacaueiro mostraram-se incompatíveis (Fig. 20).

TABELA 14 - Compatibilidade somática entre isolados de *Crinipellis pernicios* de cacaueiro (Tca 292) e cupuaçuzeiro, oriundos de diferentes municípios, do Estado do Pará.

Isolados	Tca 292	TA 692	Ab 490	C 990	CP 292	H2 292	SAT 292
Tca 292	+	-	-	+	-	-	-
TA 692	-	+	+	-	+	+	+
Ab 490	-	+	+	-	X	X	X
C 990	+	-	-	+	-	-	-
CP 292	-	+	X	-	+	X	X
H2 292	-	+	X	-	X	X	X
SAT 292	-	+	X	-	X	+	+

-Incompatível, colônias se tocando com formação de pigmentos; --: incompatível, colônias se tocando sem formação de pigmentos; ---: incompatível, colônias não se tocando; +: compatível; x: contaminação.

TA = Tomé-Açu; Ab = Abaetetuba; C = Castanhal; CP = Capitão Poço; H2 = Belém; SAT = Santo Antônio do Tauá.



FIG. 20 - Incompatibilidade somática entre micélios de *Crinipellis pernicios* de cupuaçuzeiro e de cacaueiro em meio de cultura V-8.

Experimento 4 - Teste de patogenicidade de isolados de *Crinipellis perniciosa* em *Theobroma* spp.

"Seedlings" de cupuaçuzeiro e cacaueiro foram inoculados com isolados de *C. perniciosa* de cacaueiro e cupuaçuzeiro, com o objetivo de testar a patogenicidade nos hospedeiros anteriormente citados. Foi utilizada a técnica de inoculação com disco de agar + basidiosporos, na gema apical ou no hipocótilo. Os resultados encontram-se nas Tabelas 15 e 16 e na Fig. 21.

TABELA 15 - Patogenicidade de isolados de *Crinipellis perniciosa* do *T. grandiflorum* em "seedlings" de cupuaçuzeiro e cacaueiro, através de inoculação na gema apical.

Hospedeiro	Isolados de cupuaçu		
	TA 1192	Col 193	TA 992
Cupuaçuzeiro	+	+	+
Cacaueiro	-	-	-

TA = Tomé-Açu; Col = Colares

TABELA 16 - Patogenicidade de isolados de *Crinipellis perniciosa* de *T. grandiflorum* e *T. cacao* em "seedlings" de cupuaçuzeiro, através de inoculação no hipocótilo.

Hospedeiro	Nº de planta	Isolado	
		Cupuaçu (TA 1192)	Cacau (Tca 992)
Cupuaçuzeiro	1	+	+
	2	+	+
	3	+	+
	4	+	+
	5	+	+



FIG. 21 - Mudas de cupuaçuzeiro sadia (esquerda) e com sintomas de vassouras-de-bruxa (direita), após inoculação artificial com bloco de agar.

Experimento 5 - Caracterização bioquímica de isolados de *Crinipellis pernicioso* de *Theobroma* spp.

Testes bioquímicos foram realizados *in vitro*, com o objetivo de caracterizar bioquimicamente isolados de *C. pernicioso* do cupuaçuzeiro e identificar semelhanças entre os mesmos. Os resultados encontram-se discriminados na Tabela 17 e demonstrados na Fig. 22.

TABELA 17 - Caracterização bioquímica de isolados de *Crinipellis pernicioso* do cupuaçuzeiro.

Isolado	Teste bioquímico				
	PO	AF	VAN	PE	
C 990	-	-	-	+	
CP 292	-	-	-	+	
TA 1192	-	-	-	+	
Col 193	-	-	-	+	
IGA 992	+-	-	+-	+	
SAT 292	+	-	+	+	
BEL 191	++	-	+	+	

PO: Polifenol oxidase; AF: Ácido ferrúlico; VAN: Vanilina; PE: Peroxidase; -: sem reação; +-: reação positiva fraca; + reação positiva média; ++ reação positiva forte.

C = Castanhal; CP = Capitão Poço; TA = Tomé-Açu; Col = Colares; IGA = Igarapé-Açu; SAT = Santo Antônio do Tauá; BEL = Belém

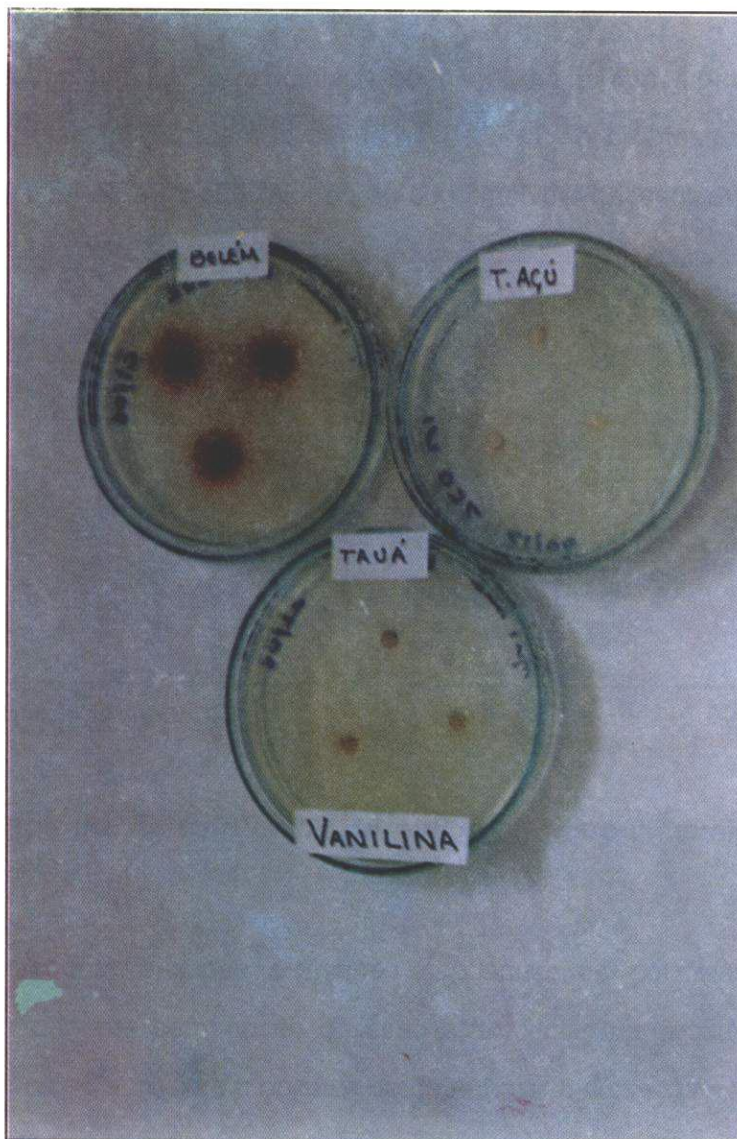


FIG. 22 - Diferentes reações de isolados de *Crinipellis perniciosia* ao teste bioquímico da vanilina.

Experimento 6 - Produção de basidiocarpos de *Crinipellis perniciosia* de *Theobroma* spp. em vassouras destacadas, sob telado

Em 1992 a produção de basidiocarpos foi registrada em vassouras destacadas, sob condições de telado, com o objetivo de definir a época de pico, para embasar estudos de controle da vassoura-de-bruxa do cupuaçuzeiro.

Observou-se que a produção de basidiocarpos foi muito baixa nos períodos de janeiro-abril e agosto-dezembro de 1992. A produção aumentou em maio, alcançando seu pico em julho (Fig. 23). A precipitação pluviométrica do período encontra-se na Tabela 18.

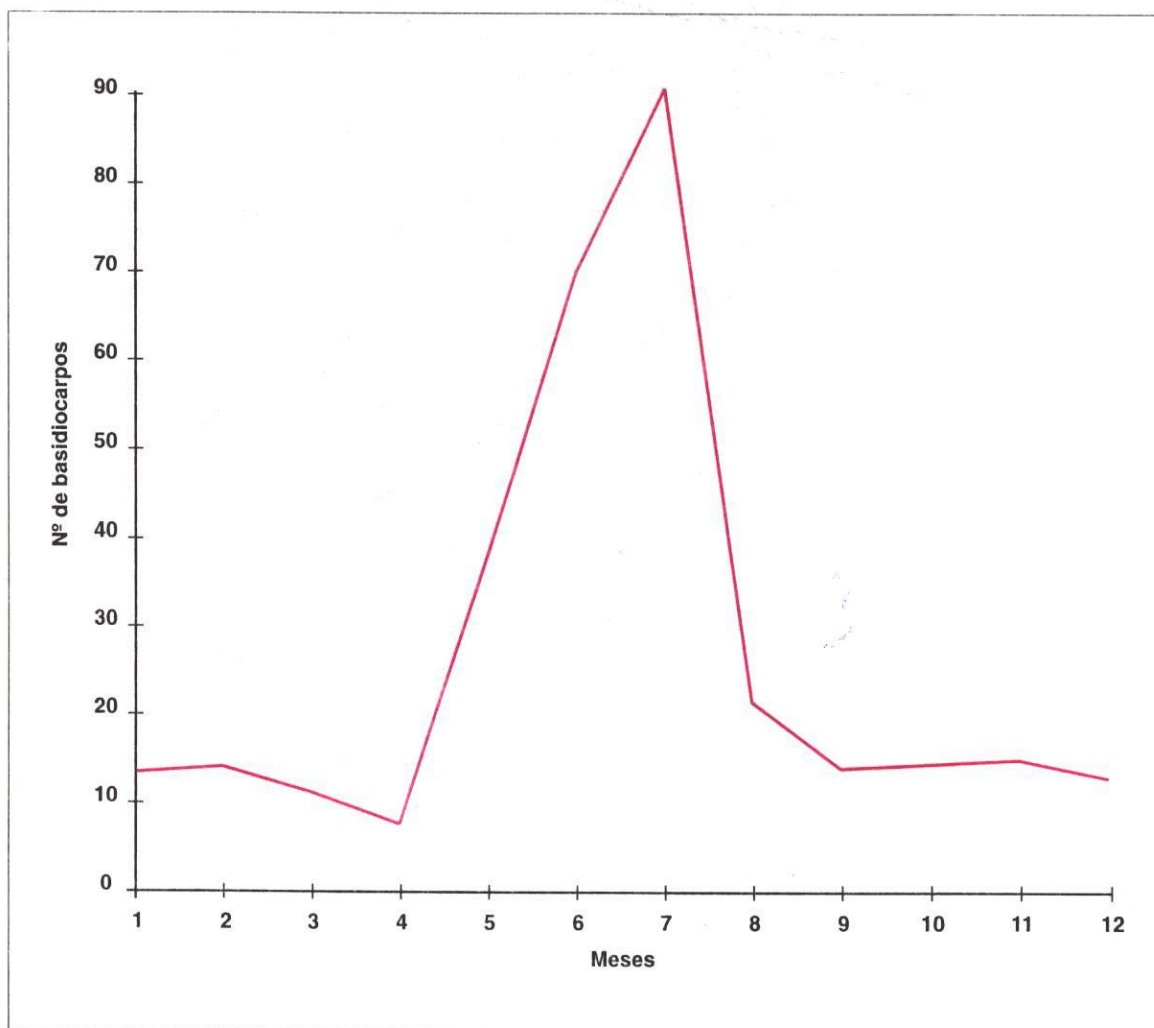


FIG. 23 - Produção de basidiocarpos de *Crinipellis perniciosus* de *Theobroma spp.*, em vassouras destacadas, sob telado.

TABELA 18 - Precipitação pluviométrica no CPATU, em 1992.

Mês	Precipitação (mm)
Janeiro	425,7
Fevereiro	710,8
Março	429,5
Abril	404,7
Maio	183,5
Junho	118,7
Julho	170,4
Agosto	84,7
Setembro	121,2
Outubro	44,2
Novembro	68,5
Dezembro	111,9

Fonte: Laboratório de Climatologia do CPATU.

Experimento 7 - Biologia de *Crinipellis perniciosa* do cupuaçuzeiro: observações de campo

As vassouras emitidas em cinco cupuaçuzeiros por mês foram marcadas e observadas desde a primeira semana de emissão até o início da produção de basidiocarpos, durante todos os meses do ano, com o objetivo de determinar o número de vassouras emitidas e o comportamento da doença no campo.

Observou-se que no período de junho de 1991 a maio de 1994 houve emissão de vassouras durante todos os meses do ano, com exceção de janeiro, novembro e dezembro de 1992 (Fig. 24) e janeiro e fevereiro de 1994 (Fig. 25). Nesses períodos, a precipitação pluviométrica costuma ser muito alta ou muito baixa, respectivamente (Figs. 25 e 26).

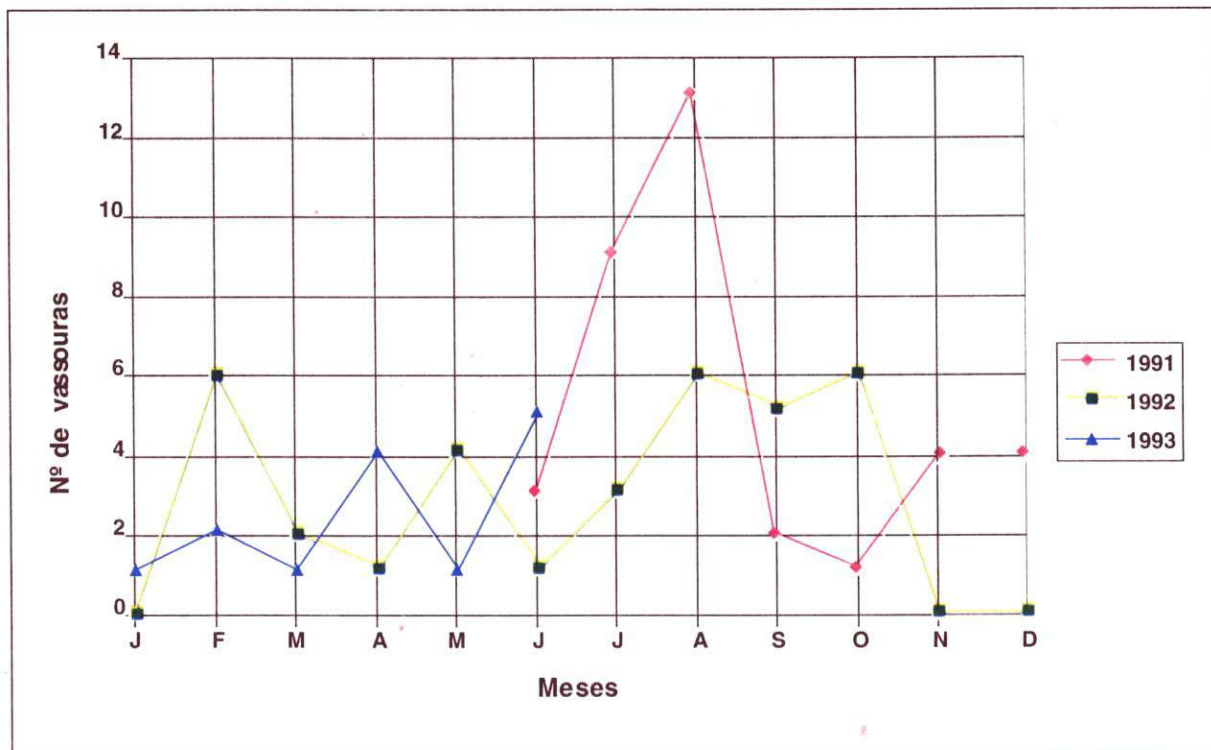


FIG. 24 - Emissão de vassouras vegetativas em cupuaçuzeiros adultos não-enxertados, em plantio sombreado no período de junho de 1991 a junho de 1993.

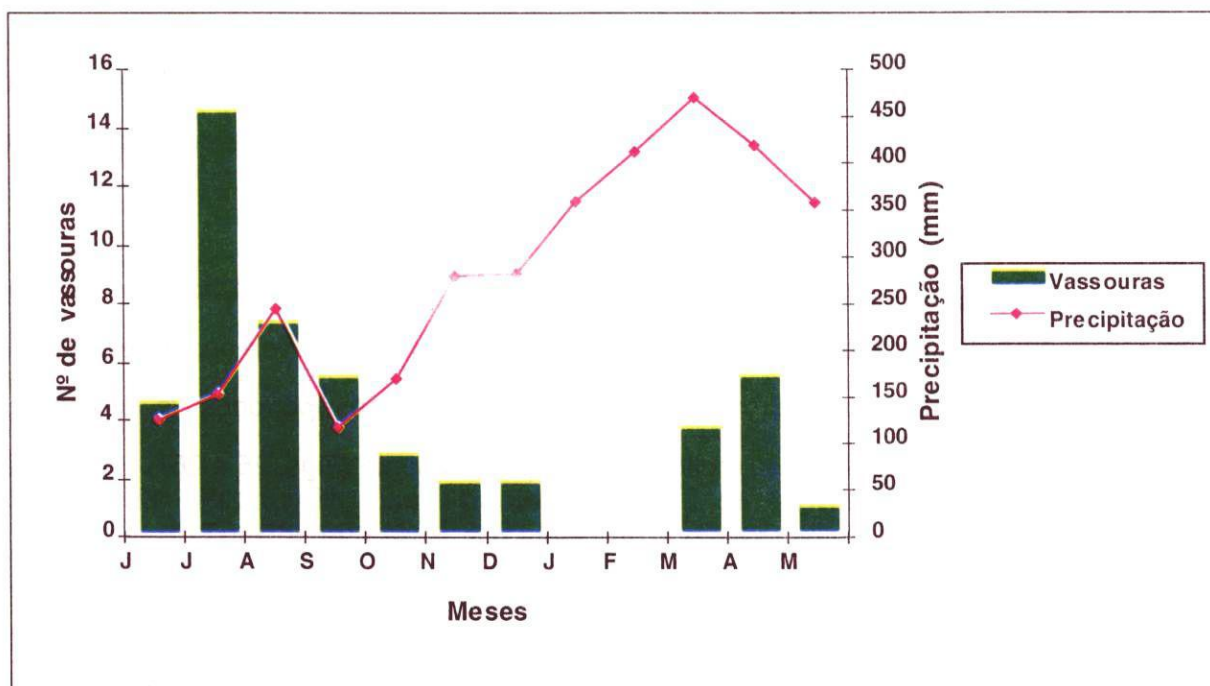


FIG. 25 - Emissão de vassouras vegetativas em cupuaçuzeiros não-enxertados, em plantio sombreado, em relação à precipitação pluviométrica, no período de junho de 1993 a maio de 1994.

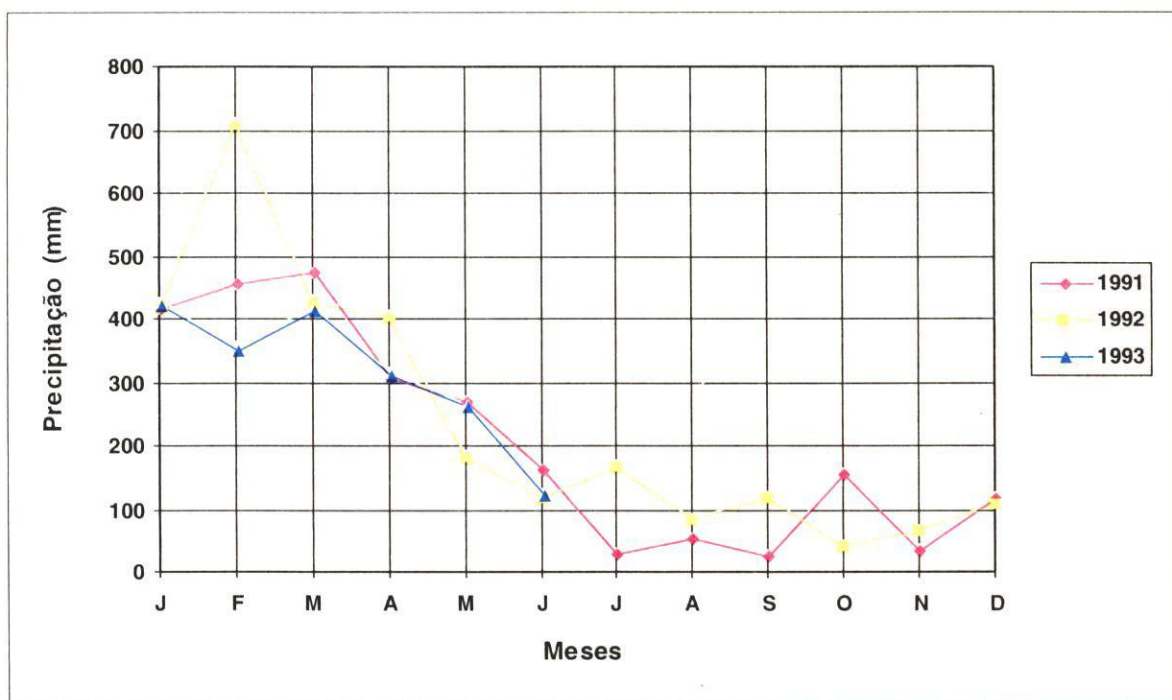


FIG. 26 - Precipitação pluviométrica média em Belém, nos anos de 1991 a 1993.

No período de junho de 1991 a abril de 1994, o comprimento das vassouras variou entre 61cm e 10cm, médias obtidas nos meses de abril de 1992 e março de 1993, respectivamente (Figs. 27 e 28).

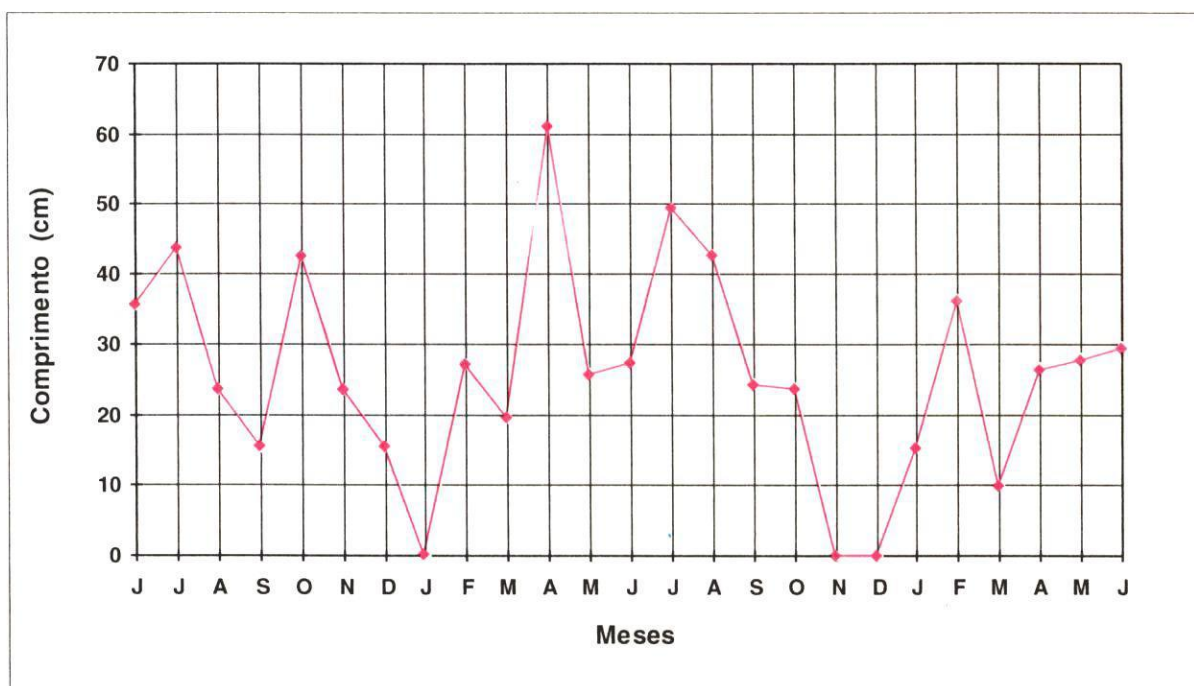


FIG. 26 - Comprimento médio de vassouras vegetativas em cupuaçuzeiro não-enxertado, em plantio sombreado, no período de junho de 1991 a junho de 1993.

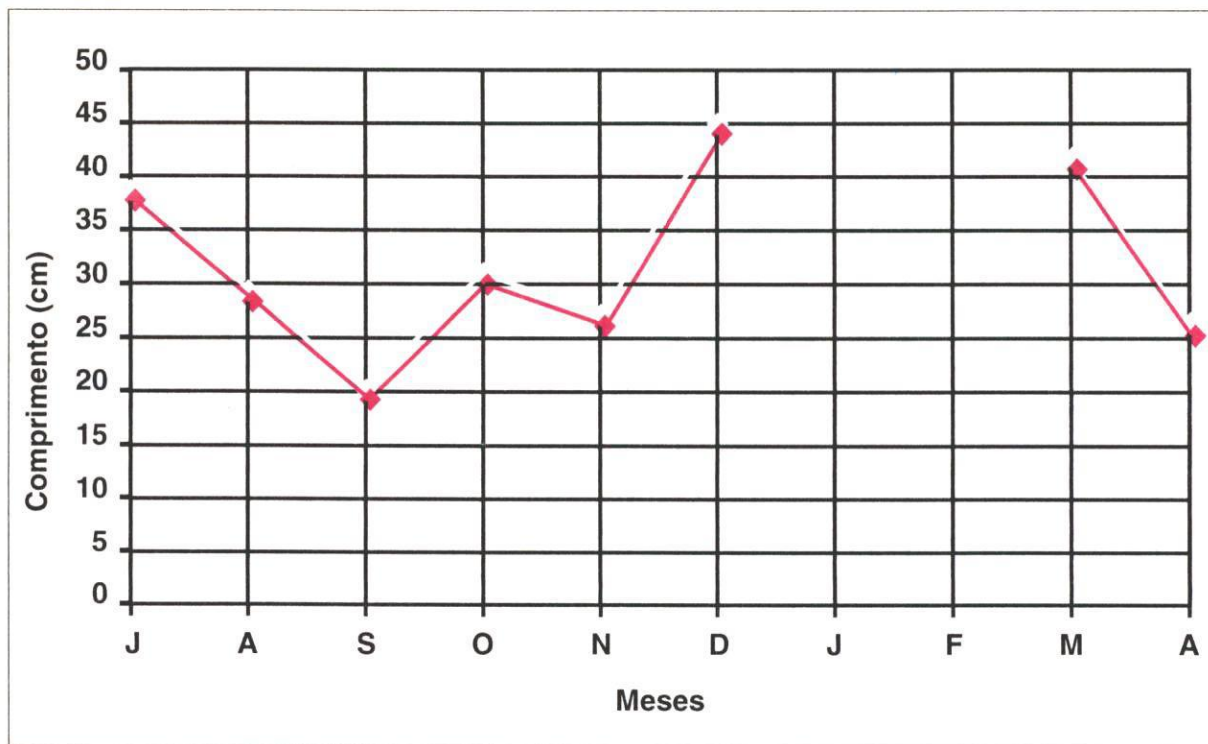


FIG. 28 - Comprimento médio de vassouras vegetativas em cupuaçuzeiros adultos não-enxertados, em plantio sombreado, no período de julho de 1993 a abril de 1994.

Entre junho de 1991 e abril de 1994, os períodos máximo e mínimo em que as vassouras permaneceram verdes foram de 67,5 e 27,8 dias, nos meses de março de 1991 e setembro de 1992, respectivamente, e de três a treze dias (Figs. 29 e 30), foi verificado o rápido secamento da base da vassoura para o ápice.

O período pré-frutificativo das vassouras vegetativas foi de até 350 dias (Fig. 31).

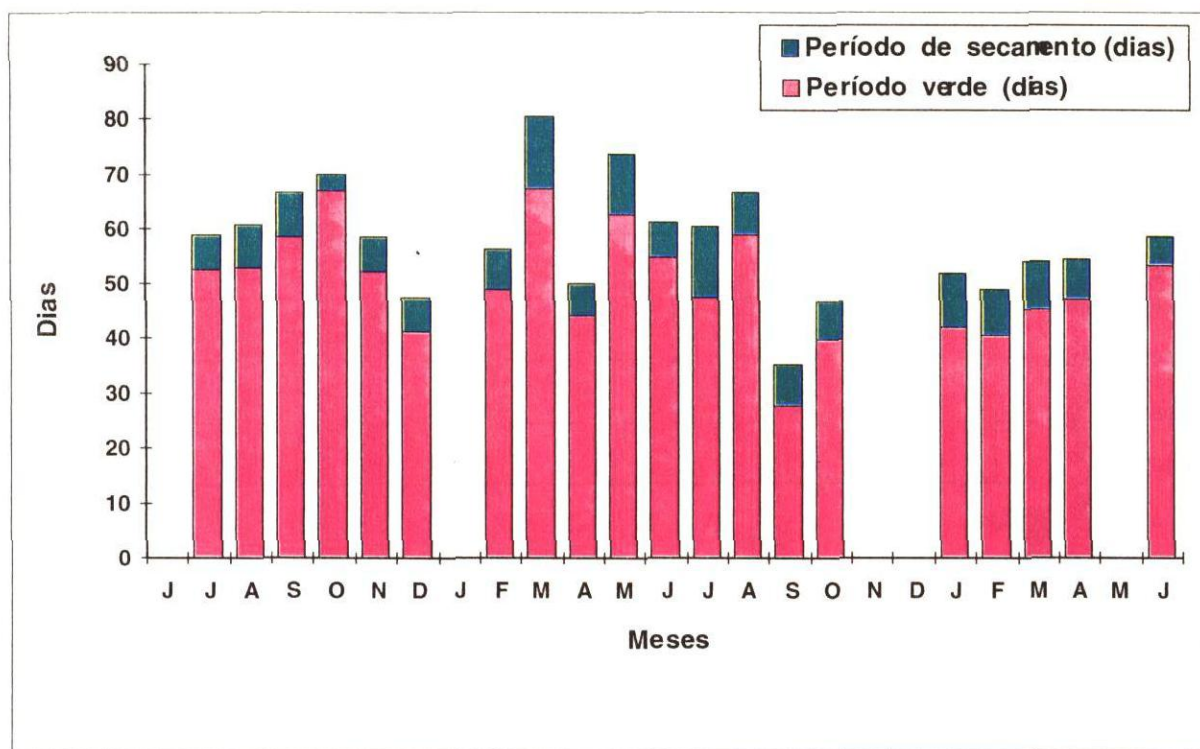


FIG. 29 - Períodos verde e de secamento de vassouras vegetativas em cupuaçuzeiros adultos não-enxertados, em plantio sombreado, no período de junho de 1991 a junho de 1993.

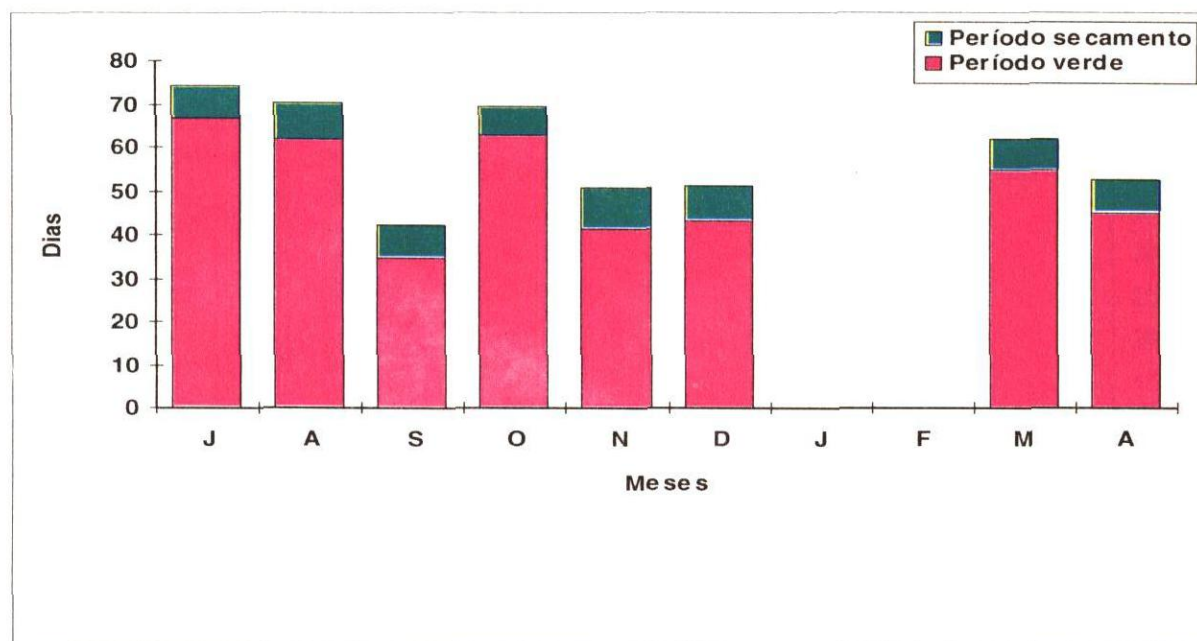


FIG. 30 - Períodos verde e de secamento de vassouras vegetativas em cupuaçuzeiros adultos não-enxertados, em plantio sombreado, no período de julho de 1993 a abril de 1994.

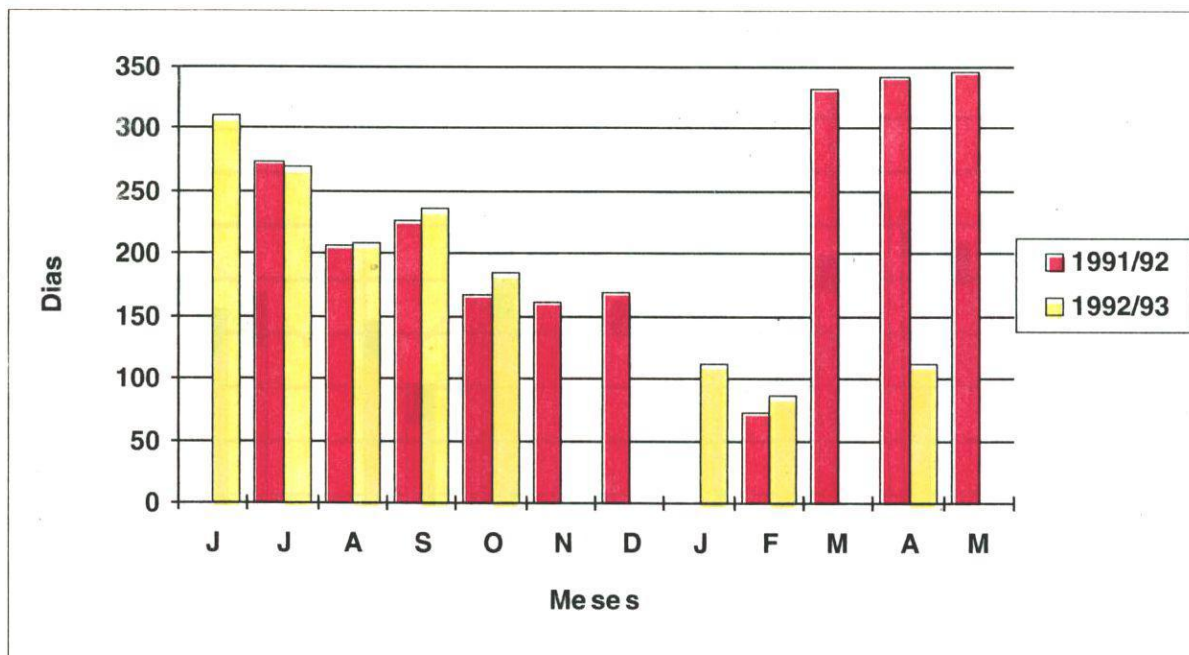


FIG. 31 - Período pré-frutificativo de vassouras vegetativas emitidas no período de junho de 1991 a maio de 1993.

A produção de basidiocarpos foi computada a partir de maio de 1992. O número de basidiocarpos foi maior nos meses de junho-julho de 1992 e julho-agosto de 1993, épocas de precipitação pluviométrica não muito elevada (Figs. 32 e 33).

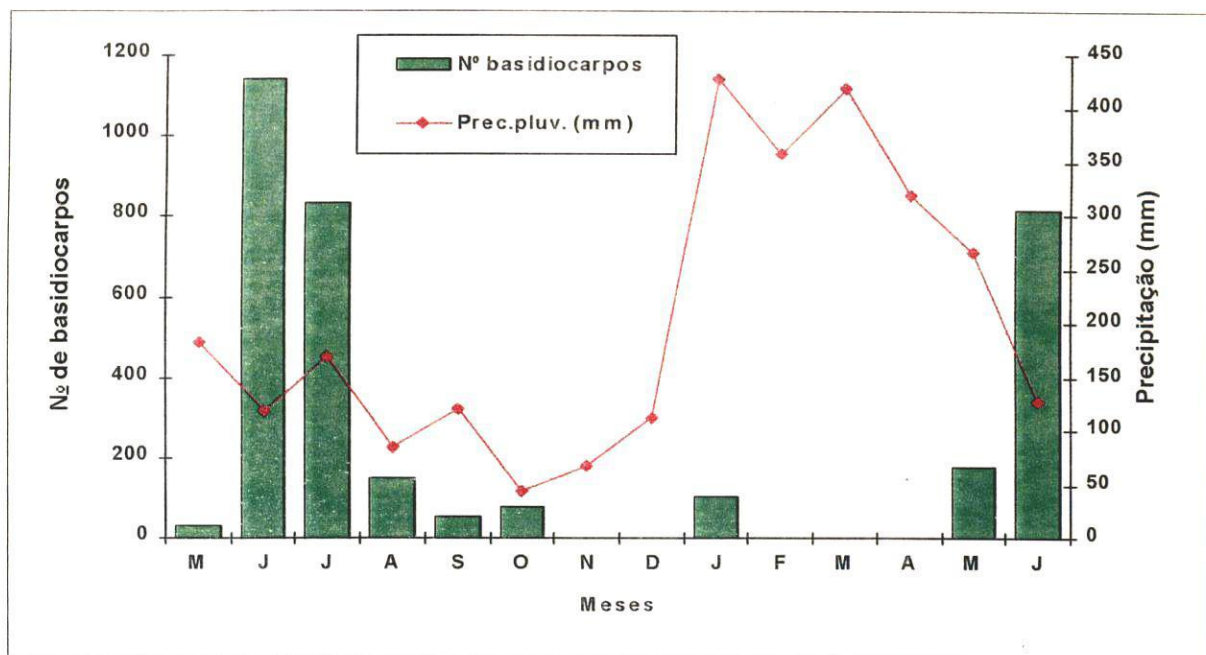


FIG. 32 - Produção de basidiocarpos de *Crinipellis pernicioso* em vassouras vegetativas de cupuaçuzeiro, no período de maio de 1992 a junho de 1993.

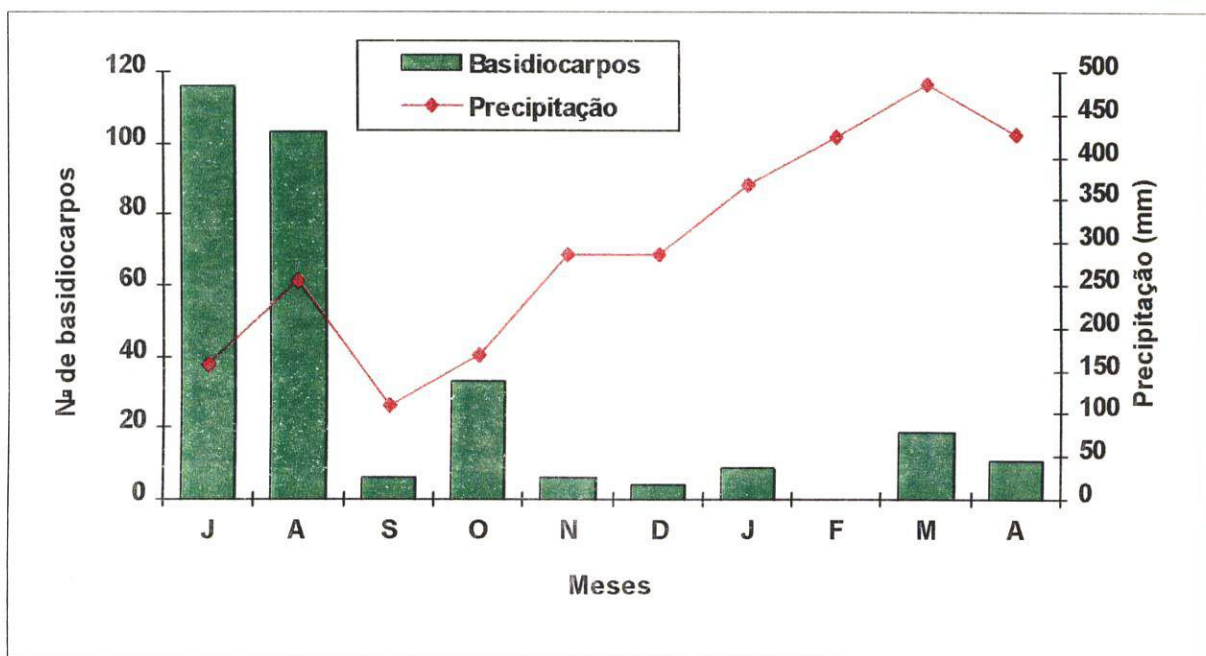


FIG. 33 - Produção de basidiocarpos de *Crinipellis pernicioso* em vassouras vegetativas de cupuaçuzeiro, em relação à precipitação pluviométrica no período de julho de 1993 a abril de 1994.

Experimento 8 - Produção artificial de basidiocarpos de *Crinipellis perniciosa* do cupuaçuzeiro

A produção de basidiocarpos de *C.perniciosa* é um fator limitante para os estudos da biologia e controle da vassoura-de-bruxa do cupuaçuzeiro, uma vez que ocorre em grandes quantidades apenas em determinadas épocas do ano.

Meios artificiais e materiais alternativos estão sendo testados em laboratório e em casa-de-vegetação, com o objetivo de suprir as necessidades de inóculo dessa doença em qualquer época do ano.

A produção de 50 basidiocarpos infectivos foi observada em culturas do patógeno em meio específico, mantidas assepticamente por dois meses em laboratório e então transferidas para telado com 50% de sombra e irrigação por seis horas diárias (Figs. 34 e 35).



FIG. 34 - Basidiocarpos de *Crinipellis perniciosa* do cupuaçuzeiro produzidos em meio de cultura artificial, sob condições de telado com 50% de sombreamento e irrigação controlada.

Alguns materiais como algodão, pedra-pomes, esponja, tecido de cupuaçuzeiro e *Mauritia setigera* (miriti) estão sendo testados. Este último foi o que mais promoveu o crescimento micelial do patógeno.

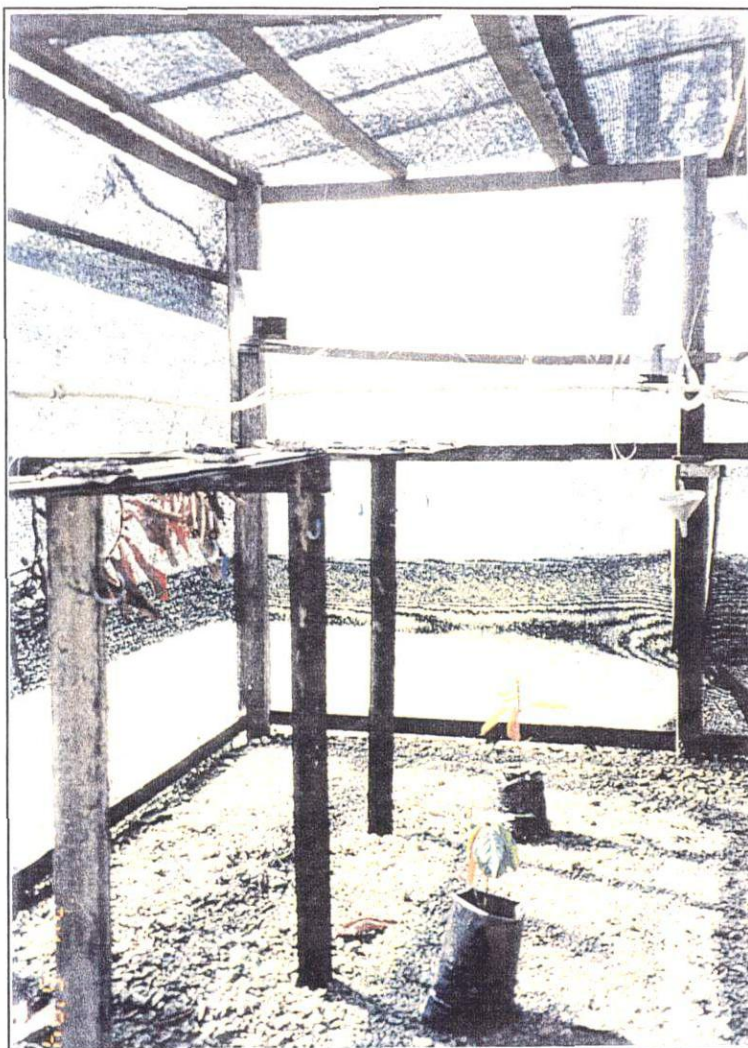


FIG. 35 - Telado sombreado com sistema de irrigação controlada, usado para experimento de produção artificial de basidiocarpos.

Continuando os estudos para a produção artificial de basidiosporos de *C. pernicioso* do cupuaçuzeiro, foi repetido o experimento em meio de farelo-vermiculita, onde se obteve a produção média de 87 basidiocarpos, todos infectivos quando inoculados em mudas de cupuaçuzeiro, sob casa-de-vegetação, em épocas onde praticamente não há produção artificial desses propágulos no campo (Fig. 36). O desenvolvimento de um método que não dependa do hospedeiro para a produção de basidiocarpos de *C. pernicioso* é de grande utilidade para os estudos biológicos, epidemiológicos e fisiológicos desse patógeno e da vassoura-de-bruxa, uma vez que poderá ser desenvolvido independentemente de época ou lugar.

hospedeiro para a produção de basidiocarpos de *C. pernicioso* é de grande utilidade para os estudos biológicos, epidemiológicos e fisiológicos desse patógeno e da vassoura-de-bruxa, uma vez que poderá ser desenvolvido independentemente de época ou lugar.

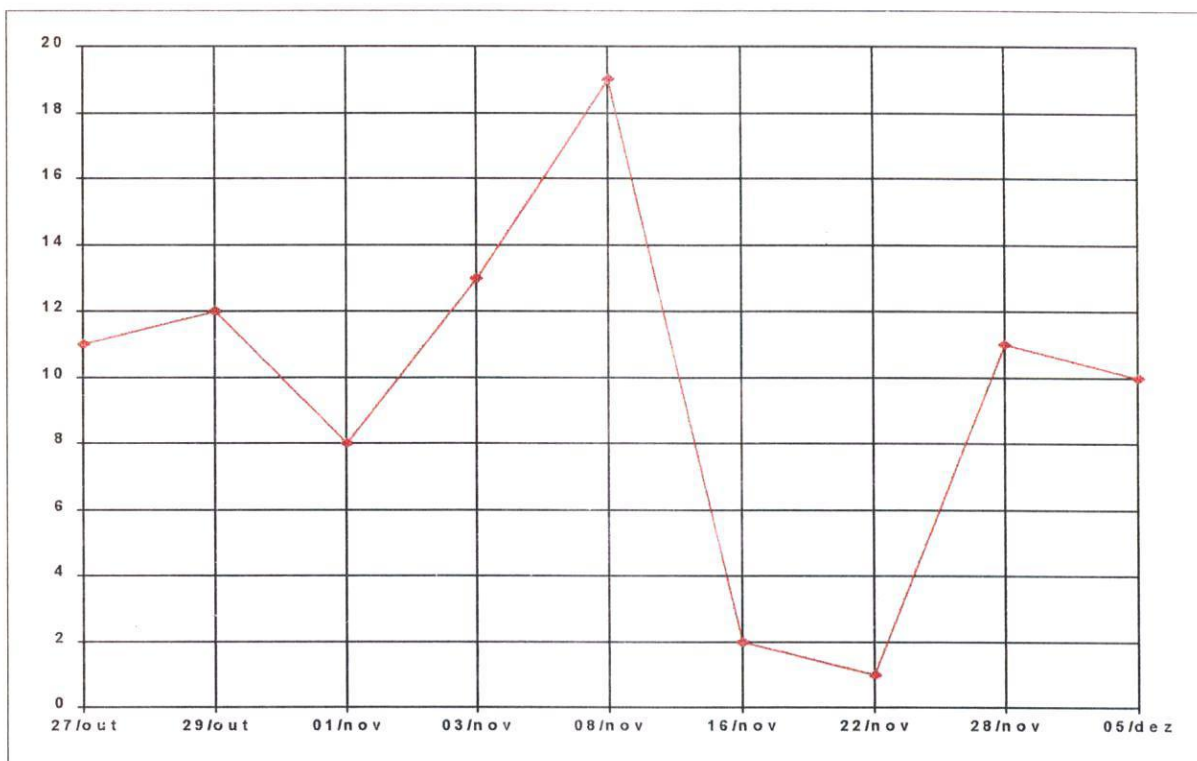


FIG. 36 - Produção artificial de basidiocarpos de *Crinipellis pernicioso* do cupuaçuzeiro em meio de farelo-vermiculita.

Experimento 9 - Avaliação fisiológica, bioquímica e de crescimento de plantas de cupuaçuzeiro sadias e infectadas por *Crinipellis pernicioso*

O cupuaçuzeiro, como outras plantas nativas da Amazônia, ainda não tem as suas exigências hídricas, luminosas e nutricionais perfeitamente identificadas e interrelacionadas. Esse desconhecimento dificulta sobretudo o estabelecimento de um sistema de produção, onde essas variáveis possam ser manejadas, principalmente quando as condições ambientais, em conjunto ou isoladamente, estiverem afetando a predisponibilidade das plantas ao ataque da vassoura-de-bruxa.

Estudos em condições semicontroladas (telado de sombrite, com interceptação de luz de 50%) estão sendo conduzidos, utilizando-se plantas provenientes de sementes de frutos

Após cinco meses de cultivo, as avaliações biométricas da ontogenia foliar das plantas têm mostrado que o crescimento inicial do cupuaçuzeiro, sob essas condições é lento, sendo que a emissão de folíolos é intermitente, passando por cinco fases bem distintas entre o início da emissão e o completo amadurecimento.

As plantas apresentaram crescimento de 17,20cm em altura, exibindo em média quatorze folhas, estando esses valores também condicionados à situação de cultivo a que as mesmas estejam sendo submetidas.

Os estudos de anatomia foliar estão em andamento, bem como os ensaios bioquímicos que avaliam o processo de enverdecimento dos folíolos, através da determinação dos teores de clorofila A, B e relação A/B, como base para os futuros estudos sobre o comportamento estomático e de fotossíntese.

Ainda não foram iniciados os estudos fisiológicos sobre plantas infectadas com *Crinipellis perniciosa*, devido às dificuldades no processo de inoculação do fungo, em função das condições de infra-estrutura desfavoráveis ao desenvolvimento do mesmo, como temperatura muito elevada e ataque de ácaros nas mudas a serem inoculadas.

Os estudos de fisiopatologia deverão ter continuidade através das seguintes ações de pesquisa:

- Avaliação da eficiência no uso de água de cupuaçuzeiros jovens, submetidos a déficits hídricos cíclicos.
- Determinação do ponto de compensação luminoso para o cupuaçuzeiro.
- Caracterização antômica e bioquímica de cupuaçuzeiros sadios e infectados por *Crinipellis perniciosa*.

Conclusões preliminares

Existe variabilidade de isolados de *C. perniciosa* de *Theobroma* spp. em relação à morfologia, compatibilidade somática, patogenicidade, características bioquímicas e ao tamanho de basidiosporos e basidiocarpo.

A produção de basidiocarpos em vassouras destacadas, sob telado, pode ser obtida o ano inteiro, com aumento significativo a partir de maio e pico em julho.

No campo, a precipitação pluviométrica muito alta ou muito baixa inibe a produção de basidiocarpos. O maior número de basidiocarpos pode ser observado nos meses de junho, julho e agosto.

A produção artificial de basidiocarpos de *C. pernicioso* pode ser obtida utilizando-se meio de farelo-vermiculita.

Difusão de tecnologia

- Apresentação de trabalho contendo resultados parciais do projeto, pelo estagiário Risaldo Muniz do Nascimento, bolsista do CNPq, durante o III Seminário de Iniciação-Científica da UFPA, no período de 6 a 10 de abril de 1992.

- Divulgação, no Programa Cultura da Terra, da TV Cultura, em Belém, Estado do Pará, dos objetivos e dos resultados alcançados no projeto.

- Divulgação no Curso de Diversificação Agronômica para extensionistas da CEPLAC, no segmento de doenças do cupuaçuzeiro, em outubro de 1992.

- Palestra sobre a vassoura-de-bruxa do cupuaçuzeiro para professores e alunos de mestrado em fitopatologia da Universidade de Brasília (UNB), em outubro de 1992.

- Apresentação de trabalhos, contendo resultados parciais do projeto, no I Seminário de Iniciação Científica do Museu Emílio Goeldi, em abril de 1993.

- Divulgação de resultados obtidos para técnicos durante a visita de avaliação da missão japonesa da JICA, em 1992.

- Curso sobre vassoura-de-bruxa para técnicos da Vale do rio Doce, em 1991.

EPIDEMIOLOGIA DA VASSOURA-DE-BRUXA DO CUPUAÇUZEIRO

Ângela Maria Leite Nunes¹
Fernando C. de Albuquerque¹
Raimundo Parente de Oliveira¹
Tatiana Deane de Abreu Sá²
Marco Aurélio Leite Nunes³
Osamu Shimizu⁴

Resumo: O projeto compreende estudos epidemiológicos da vassoura-de-bruxa do cupuaçuzeiro (*Crinipellis perniciosa*) em condições de laboratório, casa-de-vegetação e campo. A concentração de inóculo usada nos testes de inoculação de mudas foi determinada nos ensaios de casa-de-vegetação, assim como o período de incubação, o período latente e o período de geração da doença, os quais foram estudados em mudas de cupuaçuzeiro com três meses de idade. No campo, a evolução da epidemia da vassoura-de-bruxa está sendo monitorada em 200 ramos selecionados em 20 plantas cultivadas sob sombra, em área experimental do Centro de Pesquisa Agroflorestal da Amazônia Oriental da EMBRAPA, em Belém, PA, desde 1991, através da medição diária dos parâmetros climáticos (temperatura do ar, umidade relativa do ar e pluviosidade) e da avaliação semanal do número de vassouras e produção de basidiocarpos. Os estudos epidemiológicos em flores e frutos estão sendo monitorados em quatro plantas selecionadas ao acaso. Os resultados obtidos permitiram traçar um esboço do ciclo de vida de *C. perniciosa*. A concentração ótima de inóculo para induzir os sintomas de vassouras é de 5×10^5 basidiosporos/ml de suspensão contendo Tween 20 a 0,01%. O período de incubação varia de três a quatro semanas; o período latente dura cerca de onze meses enquanto que o período de geração dura doze meses. O período que vai do entumescimento dos ramos até a morte fisiológica da vassoura, ou seja, o período verde, varia de quatro a doze semanas, atingindo o pico de produção no mês de agosto, enquanto que o maior número de vassouras secas foi observado no mês de outubro. As vassouras secas começam a desprender-se mais facilmente das plantas no mês de maio do ano subsequente, após decorridos sete meses, que coincide com o final da

¹ Eng. Agr. M.Sc. EMBRAPA-CPATU. Caixa Postal 48, CEP 66.017-970. Belém, PA.

² Eng. Agr. Ph.D. EMBRAPA-CPATU.

³ Eng. Agr. M.Sc. FCAP. Caixa Postal 917, CEP 66.077-530. Belém, PA.

⁴ Consultor da Japan International Cooperation Agency - JICA. Av. Nazaré 272, Sala 105. Ed. Clube de Engenharia, CEP 66.035-170. Belém, PA.

época chuvosa. Nessa época é iniciada a produção de basidiocarpos, cujo pico ocorre no mês de junho. Das vassouras secas presas às árvores 100% produziram basidiocarpos. Do total de vassouras secas destacadas e mantidas sobre o solo e sob a copa das árvores, somente 28% produziram basidiocarpos, sugerindo uma provável ação de microrganismos no processo de composição das vassouras, alterando a produção de órgãos reprodutivos do patógeno. Nas flores e frutos infectados, os quais emergiram de ramos não-infectados, o período verde varia de três a cinco semanas, enquanto que aqueles formados em ramos infectados, o período verde dura de quatro a doze semanas. O período seco em ambos os casos durou cerca de oito meses.

EPIDEMIOLOGY OF WITCHES' BROOM DISEASE OF CUPUAÇU PLANTS

Abstract: This project involves studies on the epidemiology of witches' broom on cupuaçu plants under laboratory, green-house and field conditions. The inoculum concentration used for inoculating *Crinipellis pernicioso* on cupuaçu seedlings, was determined in green-house trials, as was the incubation period, latent period and the period in which the disease develops. These were studied in three-month-old cupuaçu seedlings. In the field, the epidemiological evolution of witches' broom (*C. pernicioso*) is being monitored in 200 selected branches of 20 plants grown under the shade, in an experimental area at EMBRAPA-CPATU, Belém, Pará. That has been underway since 1991, through daily measurements of climatic parameters (air temperature, relative humidity and rainfall) and weekly evaluations of the number of brooms and basidiocarp production. Epidemiological studies are underway, monitoring the flowers and fruit of four plants chosen at random. From the results obtained, we have been able to sketch an outline of the life cycle of the *C. pernicioso*. The optimum concentration of inoculum for inducing symptoms of brooms is 5×10^5 basidiospores/ ml of suspension containing Tween 20 at 0.01%. The incubation period varies from three to four weeks, the latent period lasts some eleven months while the generation period lasts twelve. The period that goes from the swelling of the branches to the physiological death of the broom, the green period, varies from four to twelve weeks, reaching a production peak in August, with the greatest number of brooms being observed in October. The dried brooms start to fall from the plant during the month of May of the following year, after a period of seven months, which coincides with the end of the rainy season.

Objetivo

Estudar os parâmetros epidemiológicos e o controle da vassoura-de-bruxa do cupuaçuzeiro (*Theobroma grandiflorum*).

Justificativa

O cultivo do cupuaçuzeiro na Amazônia, e em especial no Estado do Pará, tem tido incremento significativo, como consequência dos altos preços alcançados na comercialização dos frutos e derivados. Contudo, alguns fatores de ordem fitotécnica, genética e fitopatológica têm sido apontados como causas da baixa produtividade alcançada pela cultura.

A vassoura-de-bruxa, doença causada pelo fungo de *Crinipellis perniciosa*, constitui o maior problema fitossanitário da cultura. Esta afirmativa é justificada com base no potencial da cultura como mais uma alternativa econômica para o produtor, tendo em vista a fácil aceitação no mercado consumidor, constituindo-se um produto de exportação sob a forma de suco, doce, compota, sorvete e licor. A casca do fruto é utilizada, em alguns locais, como adubo orgânico, e as sementes, consideradas como sucedâneas do cacau, constituem-se ótima matéria-prima para o preparo de chocolate branco de fina qualidade, sendo considerado um alimento substancial por apresentar elevados teores de amido, proteínas e aproximadamente 48% de uma substância gordurosa comestível, bem semelhante à manteiga do cacau.

Os estudos sobre a epidemiologia da doença têm sido, praticamente, realizados na cultura do cacau, e muito pouco na cultura do cupuaçu, apesar de ser originária da região amazônica. Porém, esses estudos tornam-se necessários visto que medidas de controle eficientes só serão possíveis com o conhecimento dos parâmetros epidemiológicos que influenciam no estabelecimento da curva de progresso da doença. Baseados nestes fatos é que está sendo estudado o ciclo de vida do *Crinipellis perniciosa* em cupuaçuzeiro, para ser estabelecida a curva de progresso da doença, correlacionando-a com os fatores ambientais, para a tomada de decisões racional e eficaz para o seu controle.

Resultados parciais

Experimento 1 - Teste de inoculação com *Crinipellis perniciosa* em mudas de cupuaçuzeiro

Este trabalho teve por objetivo determinar a concentração ideal de basidiosporos de *C. perniciosa* a ser utilizada nas inoculações artificiais, visando aos estudos dos parâmetros epidemiológicos em condições controladas e em casa-de-vegetação.

Este experimento foi instalado em 1992, sendo conduzido sob condições de casa-de-vegetação. O delineamento experimental usado foi o de blocos ao acaso, com sete tratamentos, três repetições e cinco plantas úteis por parcela. Os tratamentos foram assim discriminados:

Bloco de agar-água contendo esporos de *C. perniciosa*;

Concentração de $7,5 \times 10^5$ basidiosporos de *C. perniciosa*/ml de suspensão contendo Tween 20 a 0,01%;

Concentração de $2,5 \times 10^5$ basidiosporos de *C. perniciosa*/ml de suspensão contendo Tween 20 a 0,01%;

Concentração de 5×10^5 basidiosporos de *C. perniciosa*/ml de suspensão contendo Tween 20 a 0,01%;

Concentração de 10^6 basidiosporos de *C. perniciosa*/ml de suspensão contendo Tween 20 a 0,01%;

Solução de Tween 20 a 0,01% (Testemunha) (T1);

Bloco de agar-água (Testemunha 2) (T2).

Os resultados indicaram o tratamento 5 como sendo o melhor para os estudos dos parâmetros epidemiológicos em condições controladas e em casa-de-vegetação.

Experimento 2 - Estudo da disseminação de basidiosporos de *Crinipellis perniciosa* no processo de infecção

Este ensaio teve por objetivo verificar em que condições climáticas ocorreu a liberação e dispersão de basidiosporos de *C. perniciosa*, de modo a correlacioná-los com o processo de infecção.

Os estudos foram feitos utilizando-se três lâminas de microscópio, colocadas em pontos equidistantes, na área do experimento. A avaliação consistiu em coletar estas lâminas a cada oito dias e, com o auxílio do microscópio ótico, contar o número de basidiosporos em 30 campos diferentes.

Os primeiros resultados indicaram ser o mês de julho o período de ocorrência de maior número de basidiosporos dispersos no ar.

Experimento 3 - Relação entre as condições climáticas e o progresso da doença

Este experimento teve por objetivo determinar a curva de progresso da vassoura-de-bruxa do cupuaçuzeiro e a evolução da doença em ramos, flores e frutos.

As observações foram realizadas dez ramos de cada uma das 20 plantas selecionadas, num total de 200 ramos. A avaliação consistiu em anotar a cada oito dias o número emitido de ramos sadios e com vassoura-de-bruxa.

Nas flores e frutos os estudos foram realizados em quatro plantas e consistiu em verificar, a cada oito dias, o número de flores e frutos sadios e com vassoura-de-bruxa. Os dados climáticos, tais como: temperatura, umidade relativa do ar e precipitação pluviométrica foram monitorados.

As análises dos primeiros 18 meses indicam agosto como o mês de maior ocorrência de vassouras-de-bruxa verde (Figs. 37 e 38) e o de outubro o de maior frequência de vassouras-de-bruxa secas (Figs. 39 e 40). Estas desprenderam-se da planta, com maior intensidade, em maio, ocasião em que ocorrem o início da produção de basidiocarpos (Fig. 41), cujo pico de produção verificou-se no mês de junho (Fig. 42).



FIG. 37 - Vassoura-de-bruxa verde em cupuaçuzeiro.

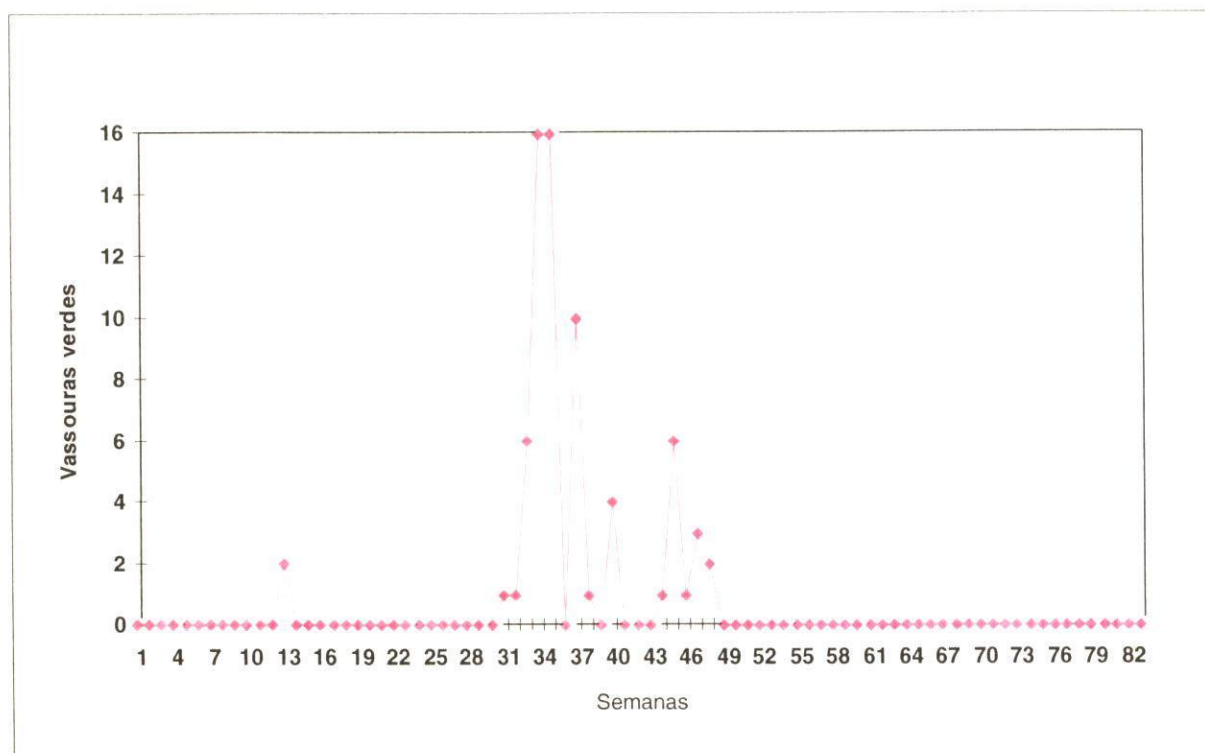


FIG. 38 - Vassouras-de-bruxa verdes, produzidas em cupuaçuzeiros.



FIG. 39 - Vassoura-de-bruxa seca em cupuaçuzeiro.

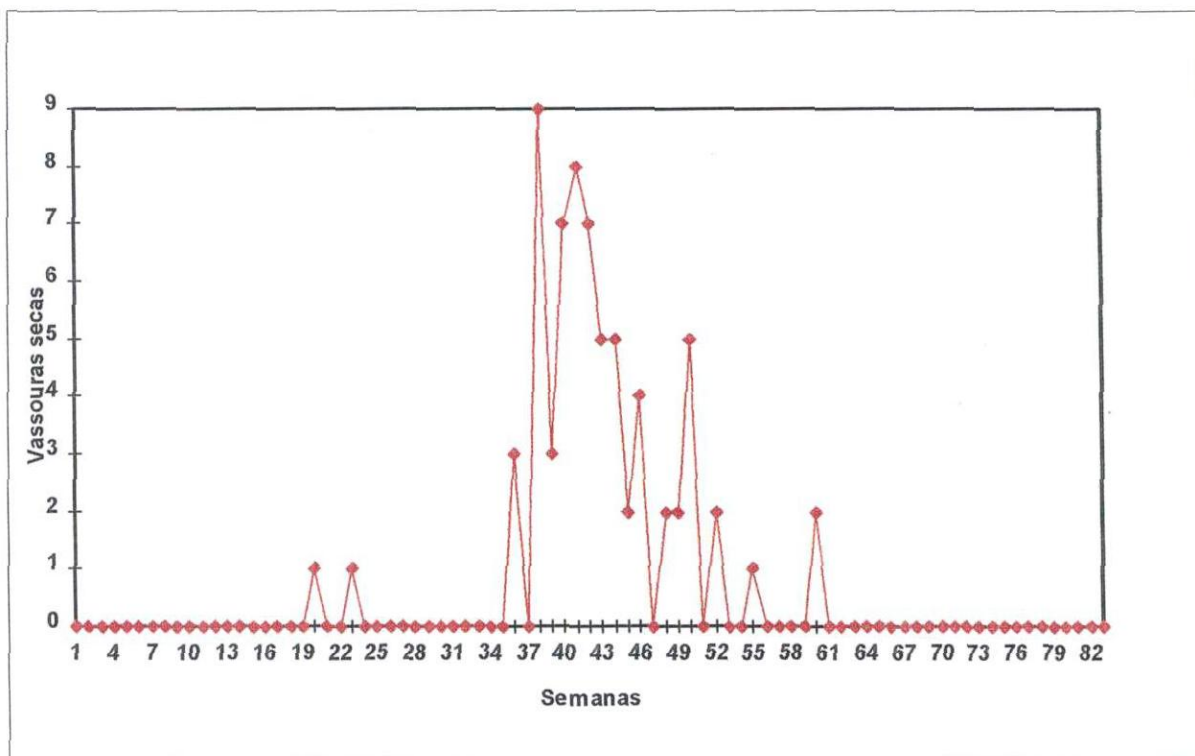
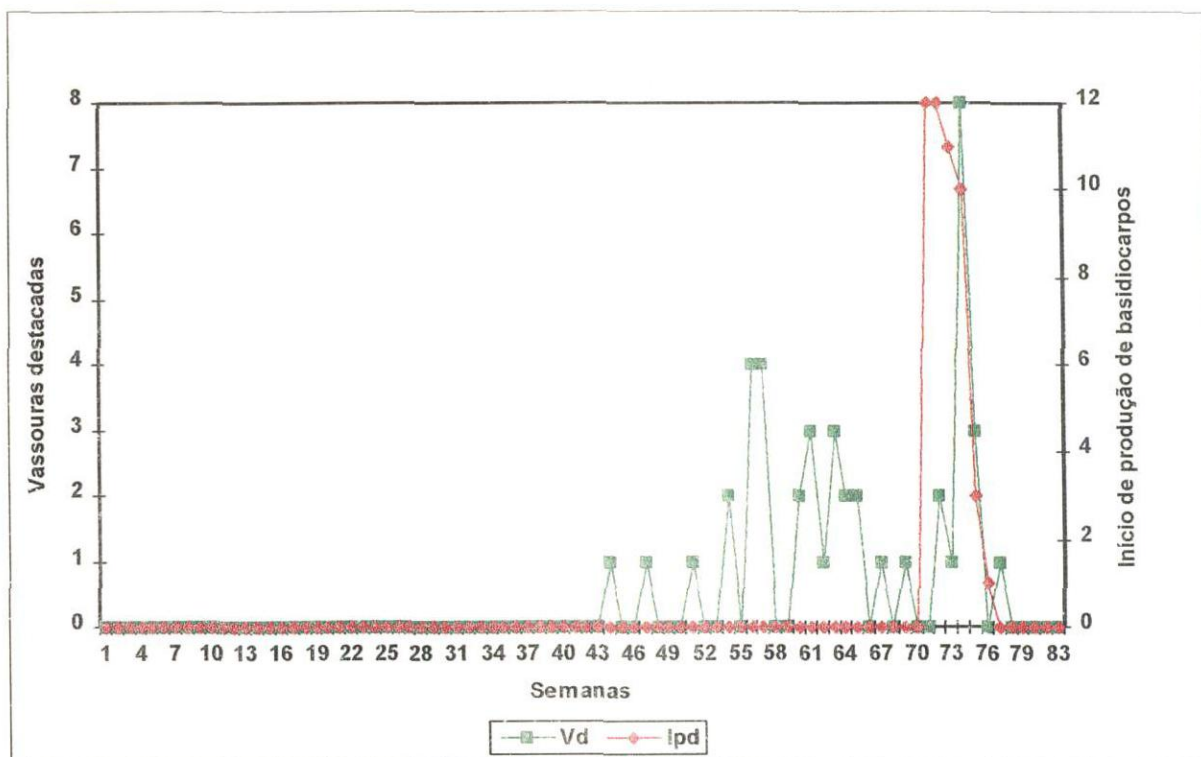


FIG. 40 - Vassouras-de-bruxa secas em cupuaçuzeiros.



Vd = Vassoura destacada; lpd = Início de produção de basidiocarpos

FIG. 41 - Vassouras-de-bruxa desprendidas das plantas e início da produção de basidiocarpos.



FIG. 42 - Vassoura-de-bruxa do cupuaçuzeiro em plena produção de basidiocarpos.

Para flores e frutos infectados, que emergiram de ramos não-infectados (Figs. 43 e 44), o período verde varia de três a cinco semanas, enquanto que para aqueles formados de ramos infectados, o período verde dura de quatro a doze semanas. O período seco, em ambos os casos, dura cerca de oito meses, ocasião em que é iniciada a produção de basidiocarpos (Figs. 45 e 46)

Os frutos podem manifestar sintomas de vassoura-de-bruxa em qualquer fase (Figs. 47 e 48).



FIG. 43 - Flores de cupuaçuzeiro infectadas com vassoura-de-bruxa.



FIG. 44 - Fruto de cupuaçuzeiro infectado com vassoura-de-bruxa.



FIG. 45 - Flores de cupuaçuzeiro com vassoura-de-bruxa e produzindo basidiocarpos.



FIG. 46 - Fruto de cupuaçuzeiro com vassoura-de-bruxa e produzindo basidiocarpos.



FIG. 47 - Fruto tipo morango produzindo basidiocarpos.

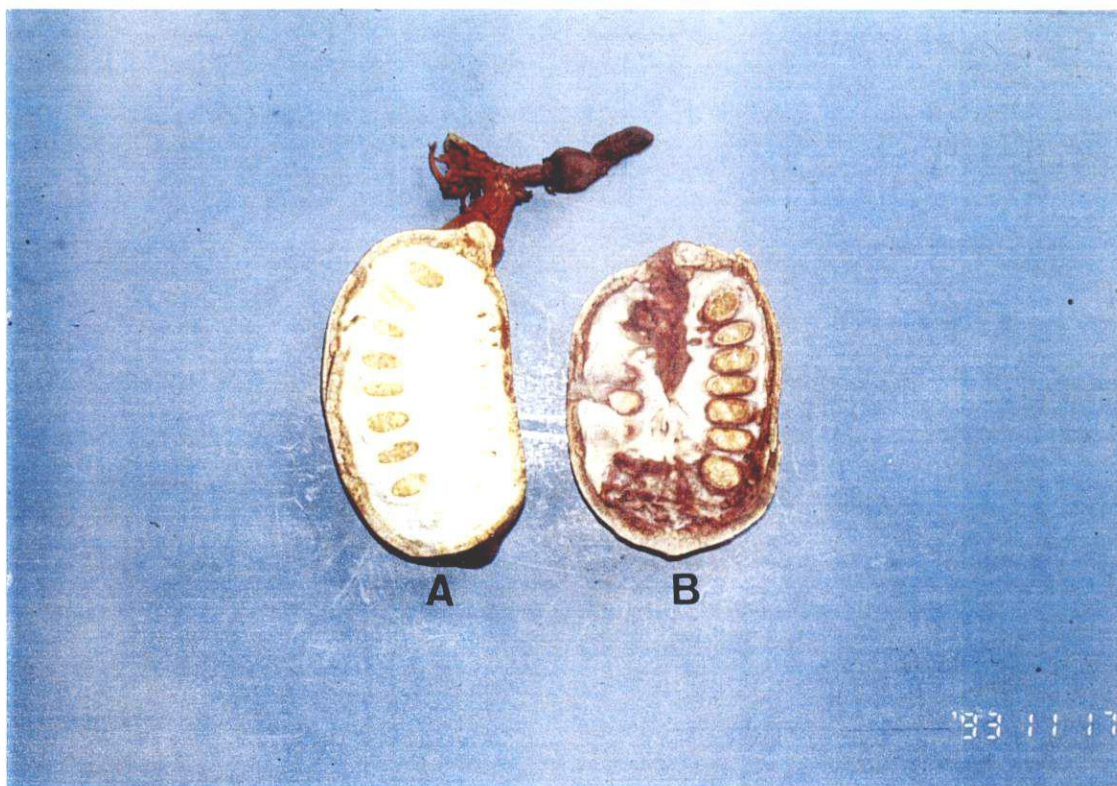


FIG. 48 - (A) Fruto do cupuaçuzeiro maduro e sadio; (B) fruto do cupuaçuzeiro maduro e com vassoura-de-bruxa.

Experimento 4 - Estudos da produção de basidiocarpos em vassouras-de-bruxa destacadas e não-destacadas

Os estudos epidemiológicos relacionados à produção de basidiocarpos de *C. pernicioso* teve por objetivo determinar a produção em vassouras-de-bruxa secas, submetidas a três posições em relação ao hospedeiro.

O experimento foi instalado no Campo Experimental da EMBRAPA-CPATU, localizado no município de Belém, PA, no período de janeiro de 1992 a julho de 1993. Na instalação do experimento foram considerados os seguintes tratamentos:

- T1.** Vassouras secas distribuídas em vassoureiros localizados sob copas de cupuaçuzeiros com mais de 40 anos de idade, em sistema de cultivo a pleno sol;
- T2.** Vassouras secas distribuídas na copa de cupuaçuzeiros com seis anos de idade, em sistema de cultivo com sombreamento;

T3. Vassouras secas distribuídas sobre liteira e sob copas de cupuaçuzeiros com seis anos de idade, em sistema de cultivo com sombreamento.

Os Tratamentos T1, T2 e T3 foram constituídos de 65, 70 e 100 vassouras-de-bruxa secas, respectivamente. O tratamento T1 foi instalado com vassouras secas produzidas no ano de 1991, enquanto que os tratamentos T2 e T3 foram instalados utilizando-se vassouras secas produzidas no ano de 1992.

A fim de evitar que as vassouras do tratamento T2, após desprenderem-se da copa das plantas, caíssem sobre o solo, todas as vassouras daquele tratamento foram amarradas e presas nos ramos das plantas com fio de nylon.

A avaliação da produção de basidiocarpos foi feita diariamente, a partir das 8:00 horas, registrando-se o número de basidiocarpos produzidos em cada vassoura, previamente numeradas, e o momento em que os basidiocarpos foram destacados e conduzidos ao laboratório para verificar a liberação de basidiosporos.

Com o intuito de subsidiar a análise dos dados de produção de basidiocarpos, foram monitorados, semanalmente, os dados climáticos de pluviosidade, temperaturas máxima e mínima e umidade relativa do ar máxima e mínima.

Após a análise dos dados representados na Fig. 49, observou-se que no vassoureiro (T1) a produção de basidiocarpos teve início na segunda quinzena de maio de 1992 (130 basidiocarpos) ocorrendo o pico de produção na segunda quinzena de julho de 1992 (428 basidiocarpos), tendo sido interrompida nos meses de fevereiro de 1993, março de 1993 e nas três primeiras semanas de abril de 1993. A partir da quarta semana reiniciou-se a produção de basidiocarpos (77 basidiocarpos), tendo ocorrido o pico de produção na primeira quinzena de julho de 1993 (200 basidiocarpos).

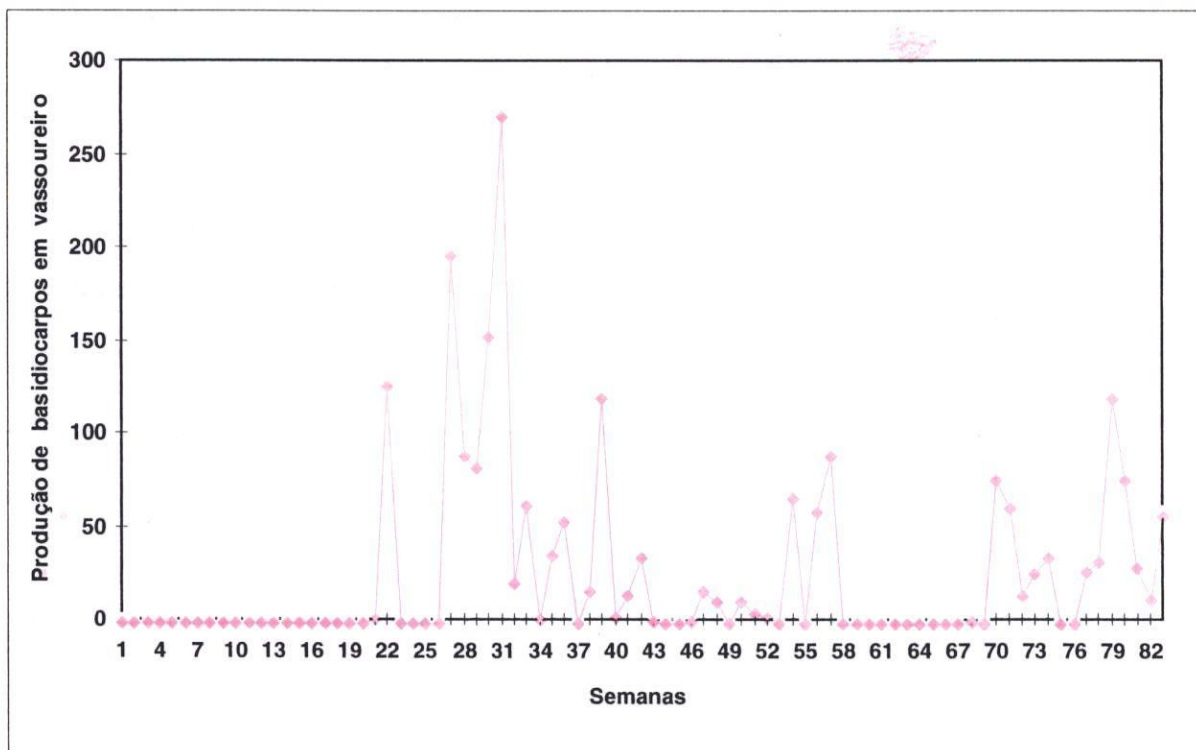
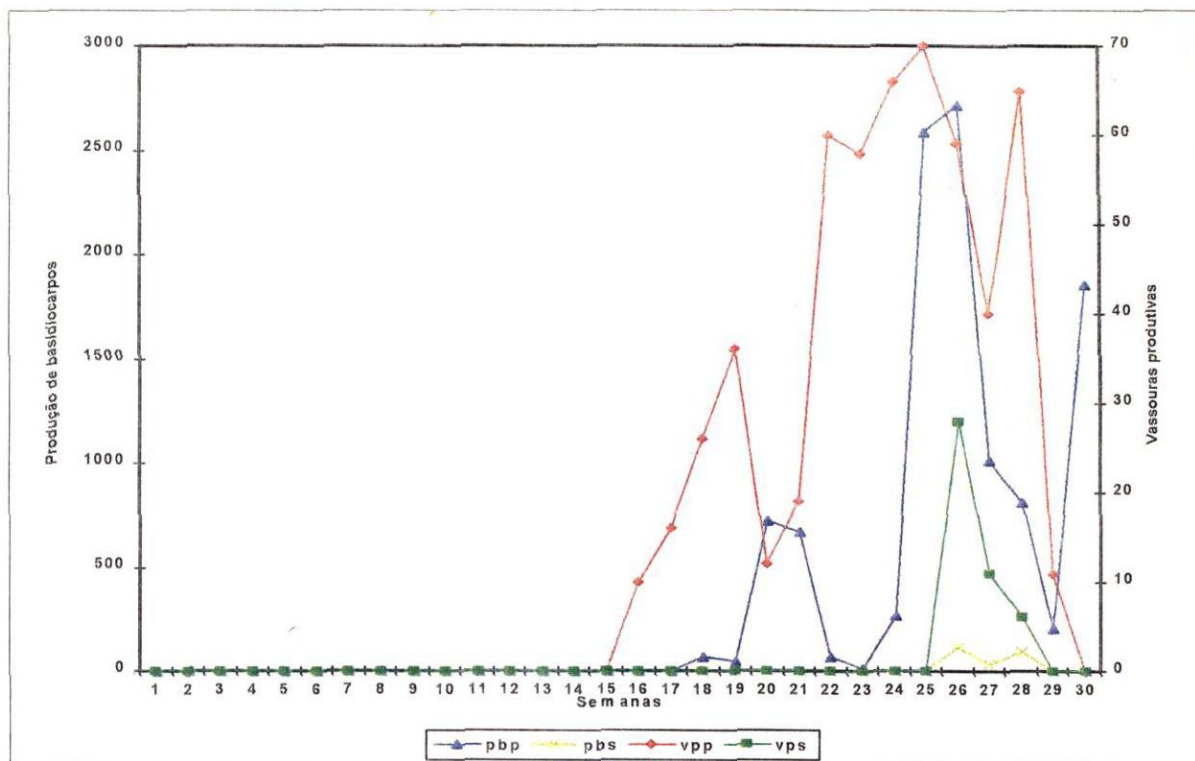


FIG. 49 - Produção de basidiocarpos no vassoureiro no período de janeiro de 1992 a julho de 1993.

Observou-se ainda que, durante o pico de produção de basidiocarpos, a quantidade produzida no ano de 1993 foi bem menor do que aquela produzida em 1992, em decorrência da deterioração das vassouras.

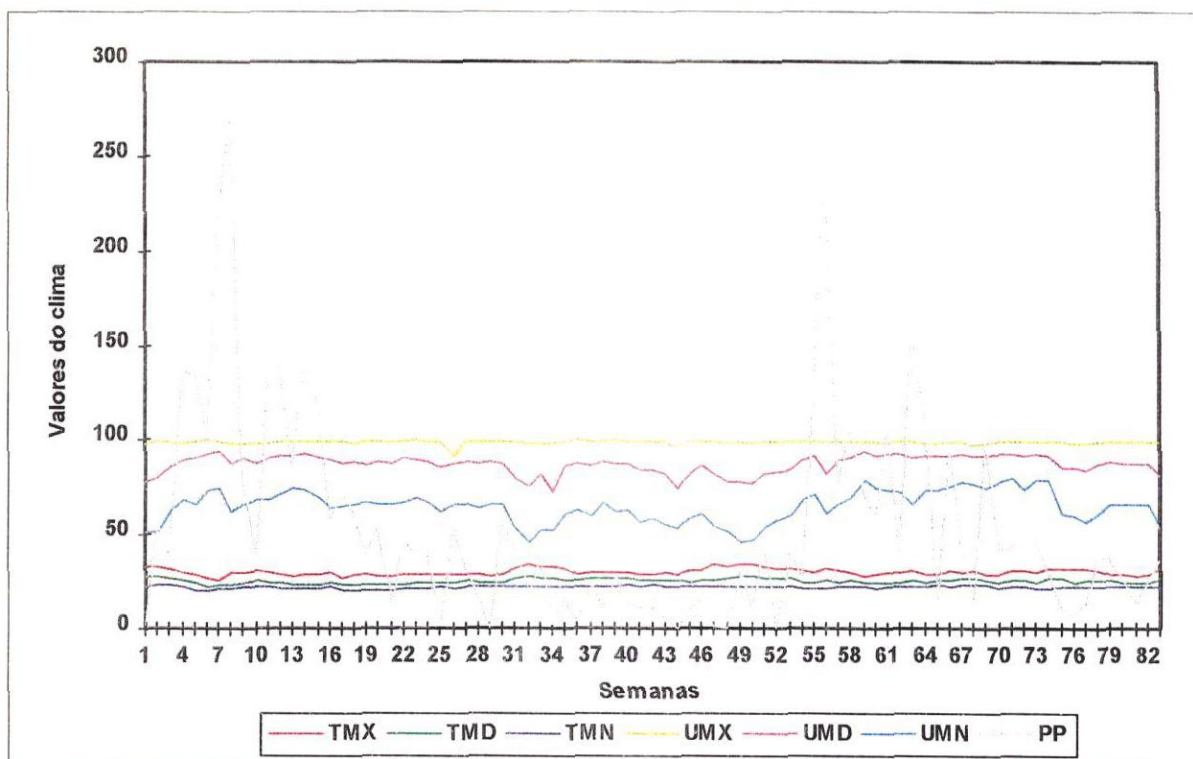
A produção de basidiocarpos sobre vassouras secas distribuídas na copa das plantas, teve início na primeira quinzena de maio de 1993 (112 basidiocarpos) em 37% das vassouras (26 vassouras produtivas), atingindo o pico máximo de produção na segunda quinzena de junho de 1993 (5.300 basidiocarpos) em 92% das vassouras (65 vassouras produtivas). Na quarta semana de junho de 1993 todas as vassouras (T2) produziram basidiocarpos. Já a produção de basidiocarpos nas vassouras distribuídas sobre liteira (T3) ocorreu apenas nas primeiras semanas de julho de 1993 (241 basidiocarpos) e no máximo em 28% das vassouras (28 vassouras produtivas) (Fig. 50). Neste caso, os 72% das vassouras que não produziram basidiocarpos (72 vassouras não-produtivas), decompuseram-se rapidamente, indicando uma possível ação de organismos que atuaram como agentes de controle biológico.



pbp = produção de basidiocarpos em vassouras na planta; pbs = produção de basidiocarpos em vassouras no solo; vpp = vassouras produtivas na planta; vps = vassouras produtivas no solo

FIG. 50 - Produção de basidiocarpos em vassouras na copa da planta e sobre liteira, no período de janeiro a julho de 1993.

Associando-se as informações anteriormente obtidas, com os dados climáticos contidos na Fig. 51, observa-se que nos meses de fevereiro, março e praticamente em todo o mês de abril, não houve produção de basidiocarpos em nenhum dos tratamentos. Este período coincide com intensa precipitação pluviométrica.



TMX = Temperatura média máxima; TMD = Temperatura média média; TMN = Temperatura média mínima; UMX = Umidade relativa média máxima; UMD = Umidade relativa média média; UMN = Umidade relativa média mínima; PP = Precipitação pluviométrica.

FIG. 51 - Evolução do clima na área do experimento durante o período de janeiro de 1992 a julho de 1993.

As temperaturas e umidades relativa médias registradas (em torno de 25°C e 80%, respectivamente), não sofreram grandes alterações no decorrer do período do experimento, mas a precipitação pluviométrica foi grandemente alterada (Fig. 51) demonstrando, assim, que este parâmetro, dentre aqueles estudados, nas condições de Belém, PA, é o que apresenta maior influência na produção de basidiocarpos.

Durante a condução do ensaio observou-se que a produção de basidiocarpos ocorreu nas primeiras horas da manhã, estando condicionada à precedência de 8 a 16 horas antes de chuvas pesadas e rápidas.

Das análises feitas em laboratório, no ano de 1992 (T1) verificou-se que a maioria dos basidiocarpos produzidos no período de maio a julho apresentaram-se grandes, túrgidos e liberaram basidiosporos intensamente. A partir de agosto teve início a redução do tamanho dos

basidiocarpos e a diminuição do número de basidiósporos produzidos. De setembro a novembro os basidiocarpos apresentavam-se pequenos e, praticamente, não produziam basidiosporos.

Experimento 5 - Estudo dos parâmetros epidemiológicos em condições de casa-de-vegetação

. Estudo do período de incubação, período latente e período de geração, em condições de casa-de-vegetação.

Para a realização deste trabalho foram utilizadas 50 mudas de cupuaçuzeiros, as quais foram inoculadas com três meses de idade, usando-se a concentração de 5×10^5 basidiosporos de *C. pernicioso*/ml suspensos em solução de Tween 20 a 0,01%.

Os resultados indicaram que o período de incubação, nestas condições, varia de três a quatro semanas. O período latente dura cerca de onze meses e o período de geração, em torno de doze meses.

Experimento 6 - Determinação do ciclo de vida do *Crinipellis pernicioso* em cupuaçuzeiros (*Theobroma grandiflorum*)

Para a elaboração do ciclo de vida do *C. pernicioso* foram utilizados os dados dos experimentos conduzidos no campo, condições controladas e semicontroladas.

Verificou-se, preliminarmente, que na evolução do ciclo de vida do *C. pernicioso* (Fig.52), os sintomas visíveis aparecem três a quatro semanas após a inoculação, quando os ensaios são conduzidos em casa-de-vegetação.

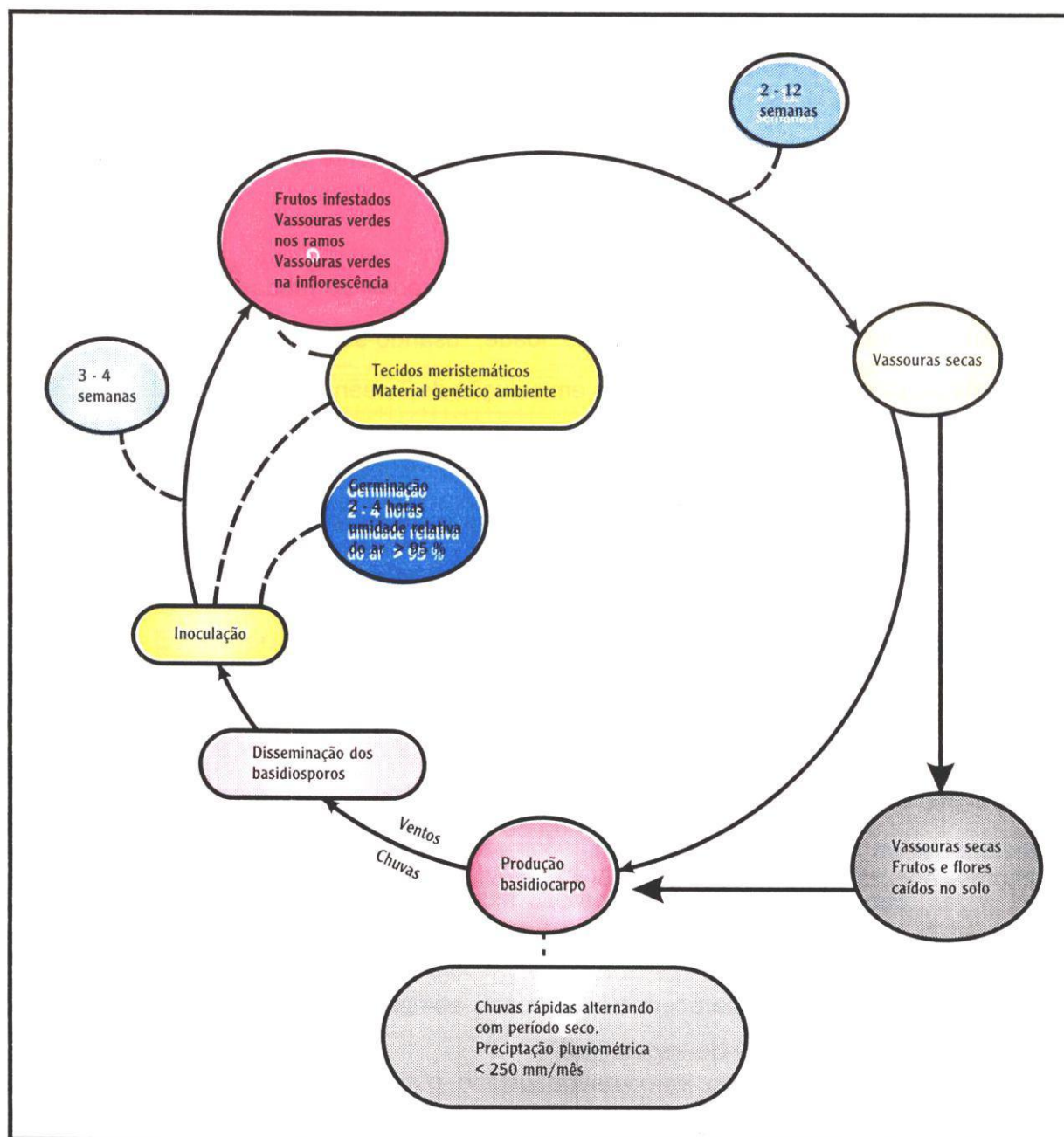


FIG. 52 - Esboço preliminar do ciclo de vida de *Crinipellis perniciosa* em *Theobroma grandiflorum* (18 meses de avaliação).

Em campo, após o aparecimento das vassouras-de-bruxa nos ramos, nas inflorescências e nos frutos infectados, todas essas estruturas vegetativa/reprodutivas da planta secam no intervalo de tempo que varia de duas a doze semanas. Observou-se, ainda, nas condições em que foi desenvolvido o ensaio, que entre os meses de maio a dezembro, quando da ocorrência de chuvas rápidas, intercaladas com período seco, precipitação pluviométrica menor ou igual a 250 mm e umidade relativa média variando entre 80 a 89%, há um estímulo na produção de basidiocarpos, enquanto que nos meses de janeiro a março, quando ocorrem chuvas freqüentes e prolongadas, com precipitação maior que 300 mm e umidade relativa média entre 90 a 94%, não se observou a produção de basidiocarpos. Estes, por sua vez, são disseminados pelo vento e chuvas e inoculados ao acaso no sítio da infecção (tecidos meristemáticos). Em condições de laboratório, a germinação ocorre entre duas a quatro horas (Fig. 53) após a sementeira em ágar-água, quando os basidiosporos são submetidos à umidade relativa maior que 95% e à temperatura de 27 ± 1 °C.

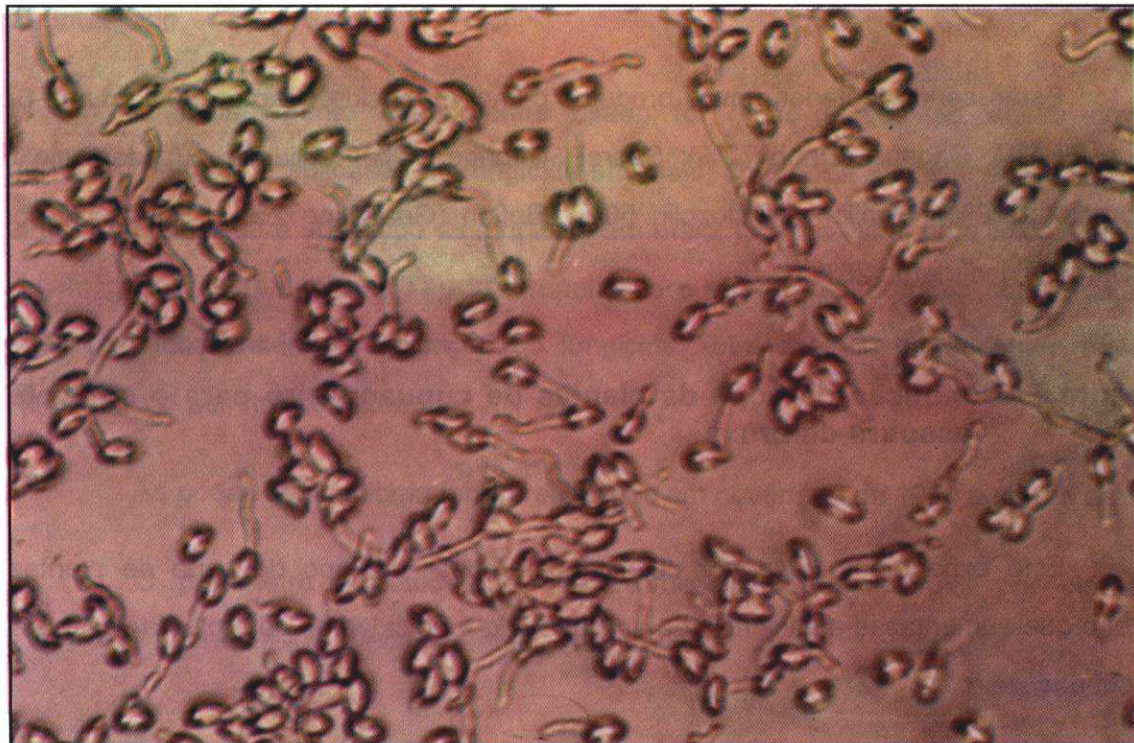


FIG. 53 - Basidiosporos de *Crinipellis perniciosa* quatro horas após a inoculação.

Os dados disponíveis indicam a poda fitossanitária para controle da vassoura-de-bruxa nos meses de outubro e novembro e março e abril.

Experimento 7 - Controle químico da vassoura-de-bruxa do cupuaçuzeiro (*Theobroma grandiflorum*).

Este experimento foi conduzido no Campo Experimental da EMBRAPA-CPATU, sendo usados quatro tratamentos: Triadimenol, 0,5g do produto comercial por litro de água; Tebuconazole, 0,5ml do produto comercial por litro de água; poda fitossanitária e o controle, que consistiu em não eliminar as vassouras-de-bruxa.

As pulverizações com os fungicidas e a poda fitossanitária foram feitas mensalmente, e as avaliações, que consistiram na contagem do número de vassouras-de-bruxa, por planta, foram feitas quinzenalmente.

Os resultados indicaram o fungicida Tebuconazole como o mais eficiente no controle da doença.

Estão sendo testados novos produtos como: Orthocide (Captan 80%); Lime-Sulfur (Polysulfide 27,5%); Dithane (Zineb 72%); Saprool (Triforine 15%); Validacin (Validamycin 5%); Rovral (Iprodione 50%); Ronilan (Vinclozolin 50%); Beflan (Guazatine 25%); Basitac (Mepronil 75%); Bayleton (Triadimefon 20%).

Experimento 8 - Condução da copa de plantas de cupuaçuzeiro para o controle da vassoura-de-bruxa

Este experimento teve por objetivo determinar um tipo de copa de plantas de cupuaçuzeiro que aumentasse a eficiência da aplicação de fungicidas no controle da vassoura-de-bruxa do cupuaçuzeiro.

O ensaio foi conduzido em três tipos de copa: taça, aberta e normal.

Em cada planta foram colocadas etiquetas nas faces superior e inferior das folhas, em cinco pontos diferentes da planta. Posteriormente, as plantas foram pulverizadas com tinta guache na concentração de 500ml/20 litros de água.

As avaliações foram feitas conforme a eficiência de cobertura das etiquetas pela tinta, dando-se notas de um a cinco.

Os resultados indicaram que a copa tipo aberta proporcionou pulverizações mais eficientes.

Experimento 9 - Controle integrado da vassoura-de-bruxa do cupuaçuzeiro

Com base nos resultados do experimento 7 e no ciclo de vida de *Crinipellis pernicioso*, instalou-se em novembro de 1994, em área de produtor, no município de Tomé-Açu, PA, um experimento com o objetivo de controlar a vassoura-de-bruxa do cupuaçuzeiro através do controle integrado.

O delineamento experimental usado foi o de blocos ao acaso com cinco tratamentos: com poda e aplicação de fungicida em maio; com poda e aplicação de fungicida em maio e junho; com poda e aplicação de fungicida em maio, junho e julho; com poda (Testemunha = T1); sem poda (Testemunha = T2), três repetições e quatro plantas úteis por parcela, sendo testados poda fitossanitária e aplicação do fungicida Tebuconazole na dosagem de 0,5g do produto comercial por litro de água.

As podas fitossanitária foram realizadas em novembro de 1994 e março de 1995.

O parâmetro avaliado é o número de vassouras-de-bruxa por planta, e as avaliações estão sendo feitas mensalmente.

Experimento 10 - Produção de basidiocarpos em vassouras-de-bruxa cortadas e não-cortadas sobre liteira

O experimento foi instalado no Campo Experimental da EMBRAPA-CPATU em dois períodos (novembro de 1994 e março de 1995), utilizando-se vassouras secas produzidas em 1994.

As vassouras em ambos os períodos, após serem destacadas, foram colocadas sobre a liteira, 50 cortadas e 50 inteiras. O número de vassouras foram iguais para os dois períodos.

O parâmetro que está sendo avaliado é o número de basidiocarpos por vassoura.

As avaliações estão sendo feitas após cada período chuvoso.

Conclusões preliminares

Os resultados obtidos até o momento, permitem emitir as seguintes conclusões preliminares:

- Concentração de 5×10^5 basidiosporos de *Crinipellis perniciosus*/ml de suspensão contendo Tween 20 a 0,01% nos testes de inoculação.
- No mês de julho ocorreu o maior número de basidiosporos dispersos no ar.
- No mês de agosto ocorreu o maior número de emissões de vassouras verdes.
- No mês de outubro observou-se a maior frequência de vassouras secas.
- O pico de produção de basidiocarpos ocorreu na segunda quinzena de junho.
- Sob condições de casa-de-vegetação, o período de incubação varia de três a quatro semanas; o período latente dura cerca de onze meses e o período de geração em torno de doze meses.

- O período verde das vassouras, flores e frutos variou de duas a doze semanas.
- O período seco das vassouras, flores e frutos durou em torno de sete meses.
- Foi estabelecido o esboço preliminar do ciclo de vida de *Crinipellis perniciosa*.
- Baseado no ciclo de vida de *Crinipellis perniciosa* recomenda-se a poda fitossanitária nos meses de outubro/novembro e março/abril.
- O fungicida Tebuconazole foi eficiente no controle da vassoura-de-bruxa do cupuaçuzeiro.

Difusão de tecnologia

- Apresentação de seminários sobre doenças do cupuaçuzeiro e seu controle a produtores e diretores da CAMTA do município de Tomé-Açu, PA, no período de 20 a 22 de fevereiro de 1995.

- Apresentação do trabalho "Produção de basidiocarpos de *Crinipellis perniciosa* sobre *Theobroma grandiflorum* em diferentes ambientes" no XXVIII Congresso Brasileiro de Fitopatologia, em Ilhéus, BA, no período de 21 a 25 de agosto de 1995.

PIMENTA-DO-REINO

- **CONTROLE BIOLÓGICO DE *Fusarium solani f. sp. piperis***
- **EXTRAÇÃO DE ÓLEO E OLEORRESINA**
- **COMPORTAMENTO DE GERMOPLASMA**

LEVANTAMENTO DE MICRORGANISMOS POTENCIALMENTE ATIVOS CONTRA *Fusarium solani* f.sp. *piperis*

Ruth Linda Benchimol Stein¹
Fernando Carneiro de Albuquerque¹
Elizabeth Ying Chu¹
Zenzaburo Abe²
Yasuo Ueda²
Shingo Yoneyama²
Tadamitsu Endo²

Resumo: Microrganismos isolados de amostras de solo, coletados da rizosfera de pimenteiras sadias situadas, em áreas de foco de fusariose, foram selecionados em duas etapas. Na primeira etapa (1991/1993), a bactéria E-15 se destacou com ação fungistática e fungicida no meio de cultura, inibindo o crescimento micelial, a esporulação de *Fusarium solani* f. sp. *piperis* em 78% e 66%, respectivamente, além de inibir a germinação de esporos. Na segunda (1994/1995), os microrganismos isolados INT-9, UND-12, MED-19 e ITO-5 foram selecionados "in vitro" para testes de antagonismo à *Fusarium solani* f. sp. *piperis* em casa-de-vegetação. Dos ramos sadios de pimenteira coletados na segunda etapa, foram obtidos 274 isolados de *F. solani*, os quais estão sendo avaliados quanto à sua patogenicidade. Os não-patogênicos ou pouco patogênicos serão utilizados em testes de proteção cruzada a *F. solani* f. sp. *piperis*. Nas mesmas amostras de solo, foram encontrados os gêneros de fungo micorrízico, *Acaulospora*, *Gigaspora* e *Glomus*, com população variando de cinco a 1.467 esporos/50g de solo, os quais estão sendo multiplicados em vasos de cultivo para testes de controle da fusariose. A determinação da ação dos fungos micorrízicos no controle biológico da fusariose está em andamento.

¹ Eng. Agr. M.Sc. EMBRAPA-CPATU. Caixa Postal 48, CEP 66.017-970. Belém, PA.

² Consultor da Japan International Cooperation Agency - JICA. Av. Nazaré 272, Sala 105. Ed. Clube de Engenharia, CEP 66.035-170. Belém, PA.

SURVEY OF MICROORGANISMS POTENTIALLY ACTIVE AGAINST *Fusarium solani* f.sp. *piperis*

Abstract: Microorganisms isolated from soil samples collected rhizosphere of healthy pepper plants situated in areas of fusarirose foci were selected in two stages. During the first phase (1991/1993), the bacteria E-15 showed the greatest fungistatic and fungicidal action in culture media, inhibiting micellial growth, fusiarirose sporulation in 78% and 66% respectively, besides inhibiting germination of spores. During the second stage (1994/1995), the isolated microorganisms INT-9, UND-12, MED-19, and ITO-5 were selected for testing their antagonism to fusarirose in Greenhouse. From healthy branches of the pepper plants collected during the second stage, 274 isolated microorganisms of *F. solani* were obtained, and their pathogenicity is being evaluated. those found to be non- or little pathogenic will be utilized in crossed protection tests of *F. solani* f.sp. *piperis*. Micorhizzic fungi of the *Acaulospora*, *Gigaspora* and *Glamus* genus were found, with populations varying from 5 to 1,467 spores/ 50g of soil, which are being multiplied in pots for future furarirose control tests. Testing is still underway to determine the action in the biological control of fusarirose of micorhizic fungi.

Objetivo

O estudo sobre o controle biológico da fusarirose da pimenta-do-reino tem como objetivo encontrar microrganismos que possam combater *Fusarium solani* f.sp. *piperis*, em casa-de-vegetação e no campo, através de antibiose, competição, proteção cruzada e micorrizas vesicular-arbusculares.

Justificativa

A fusariose da pimenteira-do-reino é a doença mais prejudicial à cultura na região amazônica, tendo dizimado milhões de pimenteiras nos últimos 20 anos. As medidas de controle preconizadas são dispendiosas, além de apresentarem restrições que interferem no controle adequado da doença, sendo necessário o estudo de novos métodos de controle.

O levantamento de microrganismos com potencial para o controle biológico da fusariose é a etapa inicial para que um novo método de controle de doenças seja definido e introduzido no sistema de produção da pimenta-do-reino como um componente do controle integrado, contribuindo, dessa forma, para a racionalização dos custos com fungicidas.

Resultados parciais

Na primeira etapa do projeto, foram testados e selecionados *in vitro* 166 microrganismos isolados de amostras de solo da rizosfera de pimenteiras sadias, em plantios infestados pela fusariose, localizados em Tomé-Açu e Santa Isabel do Pará, em relação à sua capacidade de inibir o crescimento micelial, a esporulação e a germinação de esporos de *Fusarium solani* f.sp. *piperis*. Foram também testadas diferentes densidades de esporos no solo, capazes de causar infecção no hospedeiro, bem como a patogenicidade após inibição por antagonistas.

Experimento 1 - Inibição *in vitro* do crescimento micelial de *Fusarium solani* f.sp. *piperis* por antagonistas

A inibição do crescimento micelial de *Fusarium solani* f.sp. *piperis*, em meio de cultura, foi maior na presença do antagonista E-15, cujas substâncias antagônicas produzidas permaneceram ativas por quatorze dias e foram difundidas à uma distância de até 4 cm da colônia (Tabela 19).

TABELA 19 - Ação inibitória de substâncias antibióticas produzidas por antagonistas em meio de cultura, contra *Fusarium solani* f.sp. *piperis*.

Microrganismos antagônicos	Crescimento micelial (mm)/1							
	7 dias/2				14 dias/2			
	1cm	2cm	3cm	4cm/3	1cm	2cm	3cm	4cm/3
E - 15	-	-	-	-	-	-	-	-
E - 14	-	+	++	++	-	-	+	++
D - 13	+-	+	++	+++	-	-	-	+-
D - 10	+-	+	+	++	-	+-	+	++
C - 20	-	-+	++	+++	-	+-	++	+++
I - 7	++	+++	+++	+++	++	+++	+++	+++
S1-B6	++	++	++	+++	+++	+++	+++	+++
Testemunha	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++

/1 Média de três repetições; /2 Período de incubação dos antagonistas; /3 Distância da colônia dos antagonistas;

- Sem crescimento; +- Crescimento < 0.5mm; + Crescimento > 0.5 e < 2mm; ++ Crescimento > 2 e < 4mm; +++ Crescimento > 4mm.

Experimento 2 - Patogenicidade do micélio de *Fusarium solani* f.sp. *piperis* após inibição *in vitro* por antagonistas

Alguns dos antagonistas testados apresentaram apenas ação fungistática em relação ao patógeno, paralisando o crescimento micelial enquanto ativos, mas sem matá-lo. Após retomar o crescimento na ausência dos antagonistas, *Fusarium solani* f.sp. *piperis* foi capaz de provocar infecção em estacas de pimenta-do-reino (Fig. 54).

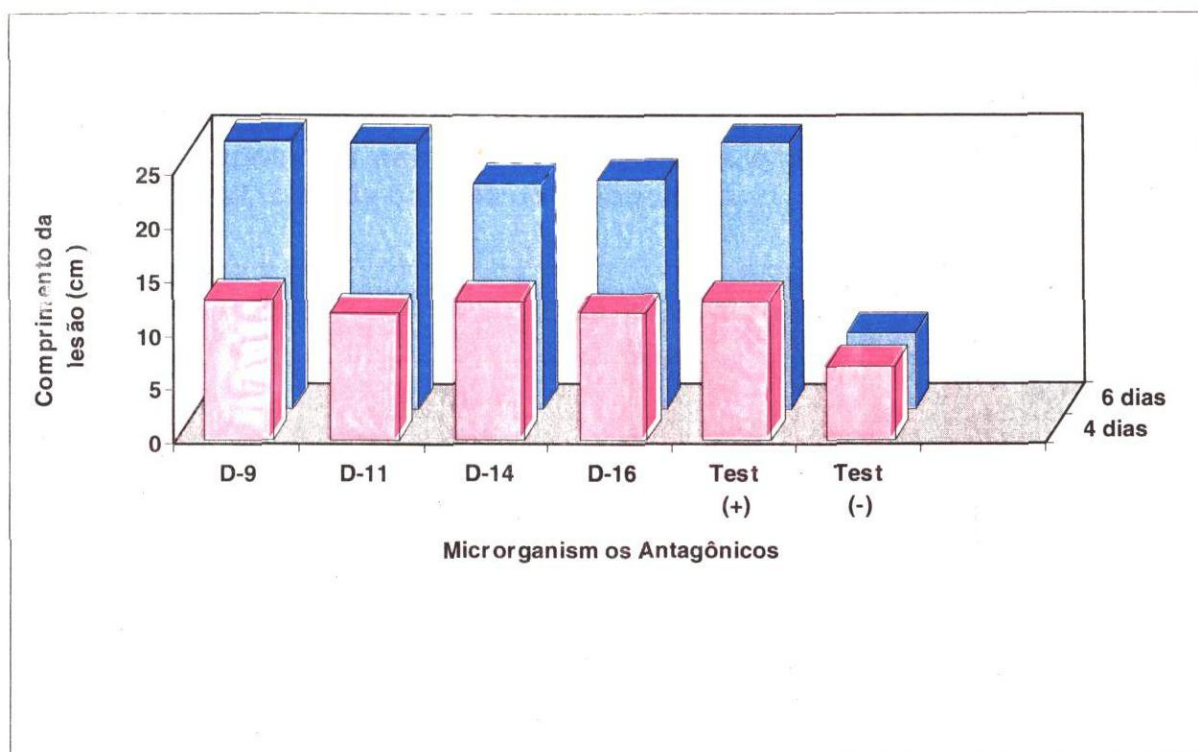


FIG. 54 - Patogenicidade do micélio de *Fusarium solani* f.sp. *piperis* após inibição por microrganismos antagônicos.

Experimento 3 - Esporulação "in vitro" de *Fusarium solani* f.sp. *piperis* na presença de antagonistas

Observou-se que os antagonistas E-15, E-14, I-7 e D-12 inibiram a esporulação do patógeno "in vitro" em 66%, 58%, 37% e 25%, respectivamente. Alguns microorganismos estimularam a produção de esporos, como pode ser observado na Fig. 55.

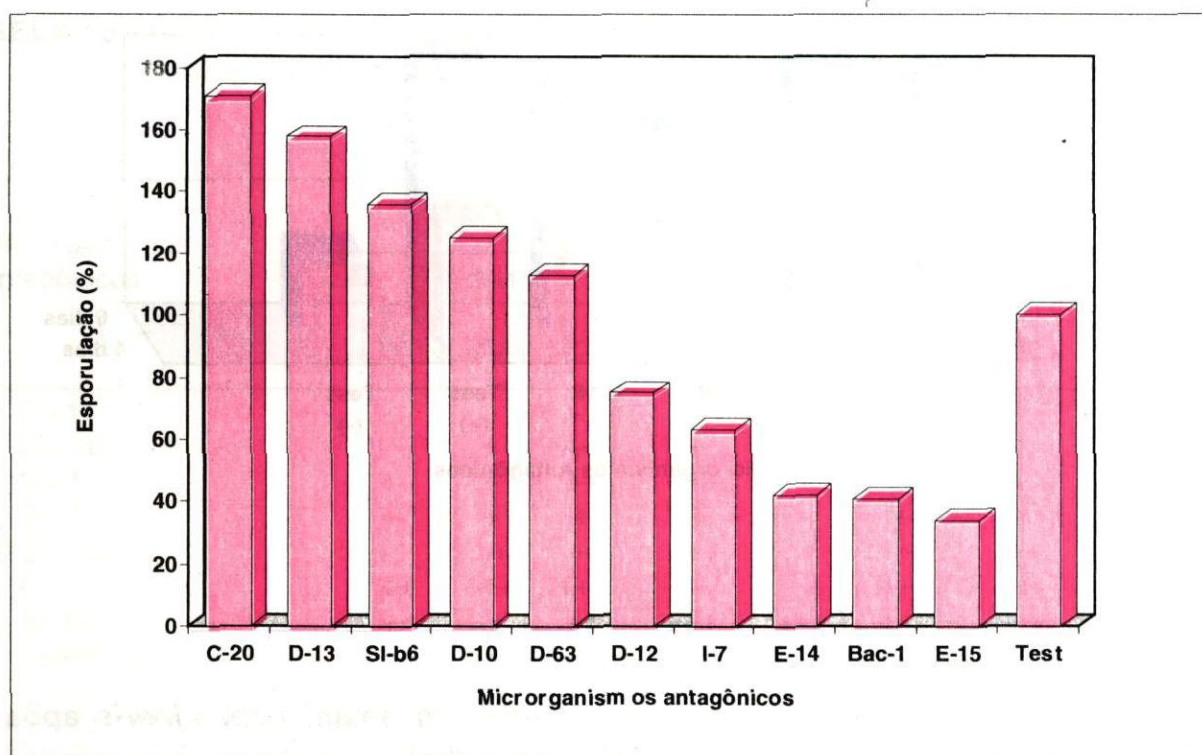


FIG. 55- Esporulação "In vitro" de *Fusarium solani* f.sp. *piperis* na presença de microrganismos antagônicos.

Experimento 4 - Inibição da germinação de esporos de *Fusarium solani* f.sp. *piperis* por antagonistas

A germinação de esporos de *Fusarium solani* f.sp. *piperis* foi inibida por substâncias antagônicas produzidas por E-15 e E-14 e difundidas em meio de cultura à distância de até 3 cm da colônia dos antagonistas (Tabela 20).

TABELA 20 - Inibição da germinação de esporos de *Fusarium solani* f.sp. *piperis* por substâncias antagônicas difundidas em meio de cultura a diferentes distâncias da colônia do antagonista.

Microrganismos antagônicos	Zona de inibição (mm) ¹					
	7 dias			14 dias		
	1cm	2cm	3cm	1cm	2cm	3cm
E - 15	2,2	0	0	9,3a ²	6,6	3,3
E - 14	2,1	0	0	5,8b	2,5	3,7
C - 20	1,4	0	0	0,9c	0,8	0,3
D - 10	1,9	0	0	0,9c	0,7	0,3
D - 13	2,2	0	0	0,8c	0,9	0,4
I - 7	0	0	0	0c	0	0
S1-B6	0	0	0	0c	0	0
Testemunha	0	0	0	0c	0	0

¹ Média de três repetições.

² Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Duncan, a 1% de probabilidade.

Experimento 5 - Influência da concentração da suspensão de esporos de *Fusarium solani* f.sp. *piperis* no aparecimento de sintomas de fusariose em "seedlings" de pimenta-do-reino

Observou-se que a ocorrência de fusariose em "seedlings" de pimenta-do-reino, com cinco meses de idade, inoculados com diferentes concentrações de suspensão de esporos de *Fusarium solani* f.sp. *piperis*, foi maior quando utilizou-se $5,4 \times 10^5$ esporos/ml (Fig. 56).

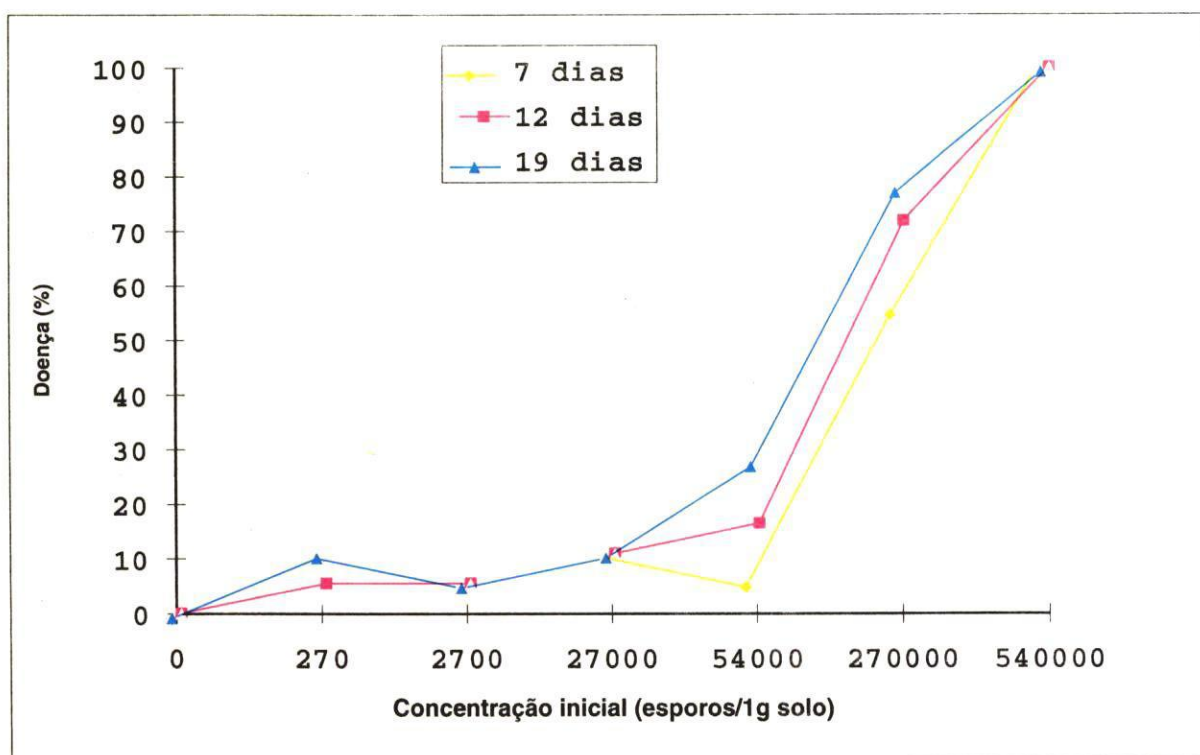


FIG. 56 - Ocorrência de doença em "seedlings" de pimenta-do-reino, provocada por diferentes concentrações de suspensão de esporos de *Fusarium solani* f.sp. *piperis*, em vasos inoculados artificialmente

Experimento 6 - Controle biológico da fusariose da pimenta-do-reino, através de microrganismos antagonísticos

Na segunda etapa do projeto, novas amostras de solo foram coletadas da rizosfera de plantas saudáveis de pimenta-do-reino, situadas ao lado de plantas doentes ou mortas (Fig. 57), em áreas de foco de fusariose, com o objetivo de obter microrganismos antagonísticos à *F. solani* f.sp. *piperis*, nos municípios de Tomé-Açu, Capitão Poço, Monte Alegre, Santarém e Paragominas (Tabela 21). Dessas amostras, foram isolados e testados 101 microrganismos, dos quais apenas quatro provocaram zonas de inibição "in vitro" a *F. solani* f.sp. *piperis* superiores a 9mm, critério determinado inicialmente para a seleção de antagonistas (Fig. 58). Os microrganismos selecionados serão testados em casa-de-vegetação, em "seedlings" e em estacas de pimenta-do-reino.



FIG. 57 - Planta sadia de pimenta-do-reino (direita) localizada em campo altamente infestado pela fusariose, selecionada para coleta de amostras da rizosfera para isolamento de antagonistas.

TABELA 21 - Origem das amostras de solo para isolamento e seleção de microrganismos com potencial antagônico a *Fusarium solani* f.sp. *piperis* (CPATU, 1994/1995).

Município	Código ^{1/}	Quantidade de microrganismos	Cultivar ^{2/}	Observações
Tomé-Açu	INT	11	Guajarina	Planta com 8 anos
	INT	11	Cingapura	Planta com 8 anos
Capitão Poço	ITO	19	Cingapura	Planta com 5 anos
	IAÇ	18	Iaçarã	Planta com 5 anos
	NED	21	Cingapura	Planta com 5 anos
	ONO	20	Cingapura	
Santarém	IWA	32	Cingapura	Planta com 5 anos
	SOK	18	Cingapura	Planta com 5 anos
	QUI	18	Cingapura	Planta com 5 anos
Monte Alegre	KSH	29	Cingapura	Planta com 6 anos
	KTO	13	Cingapura	Planta com 5 anos
	OTS	12	Cingapura	Planta com 5 anos
Bragança (raiz)	SRG	19	Cingapura	Planta com 5 anos
Ipixuna	PRI	15	Cingapura	Planta com 5 anos
Paragominas	OKJ	13	Cingapura	Planta com 5 anos
	MIN	13	Cingapura	Planta com 5 anos
	ISH	12	Cingapura	Planta com 5 anos

^{1/}Amostras de solo coletadas em três pontos diferentes da rizosfera de pimenteiras saudáveis, em áreas de foco de fusariose.

^{2/}Cultivares de pimenta-do-reino.

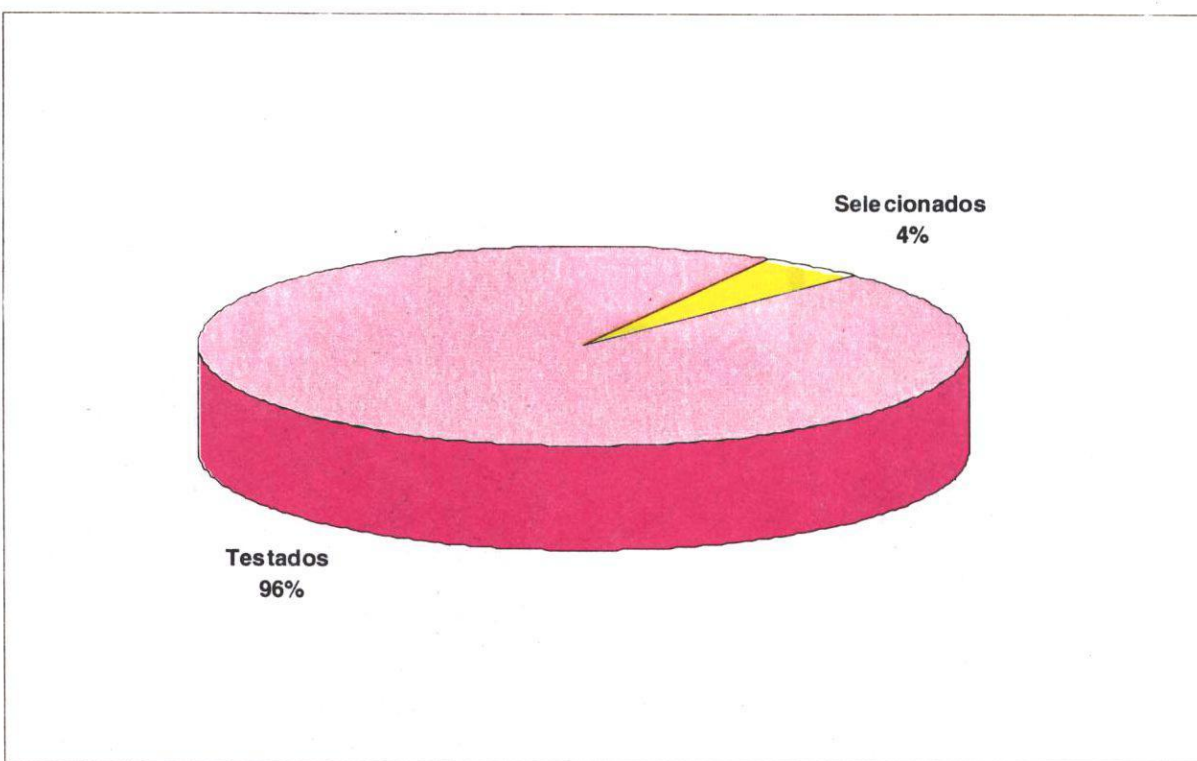


FIG. 58 - Percentual de microrganismos selecionados *in vitro* como possíveis agentes de controle de *Fusarium solani* f. sp. *piperis*, em relação ao percentual total de microrganismos testados.

Experimento 7 - Controle da fusariose da pimenta-do-reino através de proteção cruzada

Utilizando-se as plantas coletadas do isolamento de microrganismos antagônicos, principalmente dos ramos e das raízes, estão sendo obtidos isolamentos de *Fusarium* sp., os quais serão testados quanto à sua patogenicidade à pimenta-do-reino, com o objetivo de selecionar aqueles pouco patogênicos para serem utilizados como agentes de proteção cruzada à fusariose da pimenta-do-reino. De 19 amostras coletadas, em nove municípios do Estado do Pará, foram obtidos 274 isolados de *Fusarium* sp., os quais estão em fase de testes (Tabela 22).

TABELA 22 - Coleção de culturas de *Fusarium* obtidas de tecidos de ramos sadios de pimenta-do-reino.

Município	Local de Coleta	Data	Cultivar	Nº de Isolados de <i>Fusarium</i>
Tomé-Açu	CE/CPATU/INATAM	25/8/94	Guajarina	18
Capitão Poço	CE/CPATU	29/9/94	Iaçarã-1	25
	Ito (produtor)	28/9/94	Cingapura	22
Castanhal	Kamata (produtor)	4/11/94	Cingapura	25
	Yamase (*)	4/11/95	Cingapura	13
	Yamase (*)	13/3/95	Cingapura	31
Belém	CE/EMBRAPA/CPATU	6/1/95	Guajarina	32
Monte Alegre	Kishi (produtor)	8/2/95	Cingapura	27
	Kato (*)	8/2/95	Cingapura	19
	Otsuki (*)	8/2/95	Cingapura	21
Santarém	Iwama (produtor)	10/2/95	Cingapura	19
	Soki (*)	10/2/95	Cingapura	6
	Quincó (*)	10/2/95	Cingapura	16
Capanema	Ishi (produtor)	10/4/95	Guajarina	5
	Mineshita (*)	10/4/95	Cingapura	26
Ipixuna	Okajima (produtor)	12/4/95	Cingapura	24
Paragominas	Mazin (produtor)	11/4/95	Cingapura	39
	Okajima (*)	11/4/95	Cingapura	39
	Sérgio (*)	11/4/95	Cingapura	36

*Em cada amostra foram utilizados 100 pedaços de tecidos sadios de pimenta-do-reino para o isolamento de *Fusarium* spp.

Experimento 8 - Controle biológico da fusariose da pimenta-do-reino através de micorrizas vesicular-arbusculares

Objetivando verificar a possibilidade de redução da incidência de fusariose em pimenteira-do-reino, através da inoculação com fungos micorrízicos, foi conduzido um experimento preliminar com plântulas de pimenteira-do-reino, variedade Guajarina, com 45 dias de idade, em casa-de-vegetação. Foram testadas as espécies de fungos micorrízicos *Gigaspora margarita* (Central), *Glomus mossae* (Idemitsu), *Scutelospora heterogama* e *Acaulospora* sp. A inoculação foi feita durante o transplântio das mudas de sementeira para copos de plástico descartáveis (400ml) contendo solo fumigado com brometo de metila, através da deposição de uma colher de sobremesa do solo-inóculo no fundo da cova, em contato direto com o sistema radicular das plântulas. Para a testemunha não-inoculada, foi colocada no fundo da cova a mesma quantidade de solo sem inóculo. Uma solução nutritiva completa foi adicionada quinzenalmente, na proporção de 10ml/copo (Tabela 23).

TABELA 23 - Solução nutritiva completa utilizada em plântulas de pimenteira-do-reino (CPATU 1994/1995).

Reagente	Quantidade
NaH ₂ PO ₄ 1 M	1 ml
KNO ₃ 1 M	1ml
Ca(NO ₃) ₂ 1 M	2 ml
K ₂ SO ₄ 0,5 M	2 ml
(NH ₄) ₂ SO ₄ 1 M	1,5 ml
MgSO ₄ 0,5 M	2 ml
Solução de Fe-EDTA	1 ml
Solução A (para 1 litro de H ₂ O):	1 ml
H ₃ BO ₃	0,4122 g
MnCl ₂ .4H ₂ O	1,98 g
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,24968 g
MoO ₃	0,0431 g
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,28755 g

O volume final deve ser completado para 1.000 ml, com água destilada.

Três meses após a inoculação com os fungos micorrízicos foi realizada uma avaliação de altura e número de folhas emitidas pelas plântulas (Tabela 24). Em seguida, as plântulas foram transferidas para vasos de plástico com capacidade para 4kg de solo. O inóculo de *Fusarium solani* f.sp. *piperis*, previamente cultivado em mistura de solo + farelo de trigo, foi incorporado ao solo, na proporção de 0,25% (v/v), o qual foi posteriormente peneirado, para homogeneização. No fundo de cada vaso foi depositada a quantidade de 1.030g do solo inoculado com o patógeno. No ato do transplante foi feita uma reinoculação com os fungos micorrízicos em metade das plantas, inclusive no controle não-inoculado com o patógeno (*Gigaspora margarita*), através da deposição do inóculo entre o sistema radicular da planta e o solo inoculado com *F. solani* f.sp. *piperis*. Para completar o volume dos vasos foi utilizado solo fumigado, isento de fungos micorrízicos e do patógeno.

TABELA 24 - Altura e número de folhas emitidas por plântulas de pimenteira-do-reino, variedade Guajarina, três meses após a inoculação com diferentes espécies de fungos micorrízicos.

Tratamento	Altura (cm)*	Número de folhas*
<i>Acaulospora</i> sp.	10,94	6,5
<i>Scutellospora heterogama</i>	14,21	7,1
<i>Gigaspora</i> (Central)	11,94	6,5
<i>Glomus</i> (Idemitsu)	8,69	5,1
Testemunha (não-inoculada)	4,77	3,4

*Média de dez plântulas.

Novas sementes de pimenta-do-reino foram postas para germinar em areia lavada e autoclavada, de onde foram transferidas, em estágio cotiledonal, para copos de plástico (500ml) contendo solo fumigado. Os tratamentos incluíram inoculação com cinco diferentes espécies de fungos micorrízicos: *Acaulospora* sp., *Scutellospora heterogama*, *Entraphospora colombiana*, *Gigaspora margarita* (Idemitsu), *Glomus mossae* (Idemitsu) e testemunha não-inoculada. A metodologia experimental é a mesma do experimento anterior.

Simultaneamente, estão sendo feitas coletas de solo da rizosfera de pimenteiras adultas sadias, variedade Cingapura, sobreviventes de plantios em áreas atacadas pela fusariose nos municípios de Monte Alegre, Santarém, Capanema, Ipixuna e Paragominas, Estado do Pará, em busca de novas espécies nativas de fungos micorrízicos para serem testadas no controle biológico da fusariose. As amostras de solo coletadas foram conservadas em caixas de isopor com gelo, até o processamento no Laboratório do Solo, no CPATU. As amostras homogeneizadas foram divididas em três partes: 50g para extração de esporos; 50g para multiplicação dos fungos micorrízicos em vasos de cultivo e 500g para análise de solo no Laboratório de Solos. Após a extração, o número de esporos foi contado com o auxílio de lupa estereoscópica (Tabela 25). Os vasos de cultivo serão avaliados após três meses, através do isolamento e identificação das espécies. Novos vasos de cultivo serão feitos com as espécies separadas, para serem usados como fonte de inóculo em estudos sobre o controle biológico da fusariose da pimenteira-do-reino.

TABELA 25 - Quantidade de fungos micorrízicos encontrada em amostras de solo coletadas em diferentes municípios do Estado do Pará.

Município	Código	Número de esporos por 50g de solo	Gênero
Monte Alegre	001	17	<i>Acaulospora; Gigaspora</i>
	002	05	<i>Acaulospora</i>
	003	15	<i>Acaulospora; Glomus</i>
Santarém	004	81	<i>Acaulospora; Glomus</i>
	005	10	<i>Acaulospora; Glomus</i>
	006	76	<i>Acaulospora; Glomus</i>
	007	63	<i>Acaulospora; Glomus</i>
Capanema	008	35	<i>Acaulospora; Glomus</i>
	009	08	<i>Acaulospora</i>
Paragominas	010	1.467	<i>Acaulospora; Glomus</i>
	011	17	<i>Acaulospora; Glomus</i>
	012	22	<i>Acaulospora; Glomus</i>
Ipixuna	013	369	<i>Acaulospora; Gigaspora; Glomus</i>

Conclusões preliminares

A bactéria E-15 apresentou ação fungistática e fungicida contra *Fusarium solani* f. *sp. piperis* em meio de cultura.

Os antagonistas isolados E-15, E-14, 1-7 e D-12 inibiram a esporulação de *Fusarium solani* f. *sp. piperis* "in vitro".

A germinação de esporos de *Fusarium solani* f. *sp. piperis* foi inibida por substâncias antagônicas produzidas por E-15 e E-14 em meio de cultura.

A concentração de $5,5 \times 10^5$ esporos/ml de suspensão de esporos de *Fusarium solani* f. *sp. piperis* causou a maior ocorrência de fusariose em "seedings" de pimenteira-do-reino com cinco meses de idade.

Dos microrganismos isolados das amostras de solo coletadas, em cinco municípios do Estado do Pará, apenas 4% apresentou ação antagônica sobre *F. solani* f. *sp. piperis* "in vitro".

De 19 amostras de ramos sadios de pimenteiras, coletadas em nove municípios do Estado do Pará, foram obtidos 274 isolados de *Fusarium solani* para testes de proteção cruzada contra *F. solani* f. *sp. piperis*.

Das amostras de solo coletadas, em cinco municípios do Estado do Pará, foram encontrados três gêneros de fungo micorrízico, com a população variando de 5 a 1.467 esporos/50g de solo.

Difusão de tecnologia

- Apresentação dos resultados obtidos, através de palestras, durante a visita da Missão Japonesa de Avaliação do Convênio CPATU/JICA, em outubro de 1992 e dezembro de 1993.

- Divulgação de resultados experimentais durante a visita do Dr. Matsuda, Chefe do Projeto Pimenta na República Dominicana, e uma equipe de quatro pesquisadores, em 1992.

- Divulgação de resultados experimentais durante a visita do Dr. Tsão, da Universidade de California, especialista em *Phytophthora*, em 1991; e para dois técnicos da República Dominicana, durante aula sobre doenças de cultura da pimenta-do-reino, como parte de treinamento oferecido pelo CPATU.

- Apresentação de dois trabalhos científicos - "Levantamento de microrganismos para o controle biológico da fusariose" e "Ecologia de *F. solani* f. sp. *piperis*" - em reunião técnica na Universidade Kinki, em Nara, Japão, em abril de 1993.

- Apresentação de trabalho científico, na forma de Poster, sobre o levantamento de microrganismos potencialmente ativos contra *F. solani* f. sp. *piperis*, durante o Congresso Brasileiro de Fitopatologia, em Aracaju, SE, em agosto de 1993.

EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO ÓLEO E OLEORRESINA DA PIMENTA-DO-REINO

Célio Francisco Marques de Melo¹

Sebastião Hühn¹

Wilson Carvalho Barbosa¹

José Furlan Júnior²²

Kenichi Asano³

Tetsuo Ohmura³

Resumo: A diversificação em outras formas de aproveitamento da pimenta-do-reino, com a obtenção do óleo essencial e do oleorresina, dará garantia quanto aos teores de piperina, eliminação da contaminação da salmonela, qualidade do produto, estabilização de preços e agregação de valores, permitindo a ocupação de um contingente de aproximadamente 400.000 homens/dia durante a colheita e a estabilidade de preços no mercado. As vantagens de comercializar, ao invés da matéria-prima agrícola, outras formas mais elaboradas dessa especiaria, são óbvias. No caso do processamento da pimenta-do-reino para obtenção do óleo e do oleorresina, haverá mobilização de mão-de-obra local, além do lucro da industrialização e a possibilidade de dar um destino mais racional ao produto de classe inferior que, em vez de exportado e comercializado por preços aviltados, poderá ser transformado em produto industrial de elevado valor, abrindo-se novos mercados. A pesquisa objetiva extrair e caracterizar o óleo e o oleorresina de algumas cultivares de pimenta-do-reino, determinando os teores de piperina e suas características físico-químicas. A extração do óleo essencial foi feita, tanto em laboratório como em usina-piloto, por arraste com vapor d'água. A fração resina foi extraída utilizando-se álcool etílico como solvente. Os resultados obtidos indicaram baixos teores de resina e óleo essencial extraídos em usina-piloto mostrando que o processo deve ser otimizado, devendo os mesmos serem repetidos nas safras de 1994 e 1995. Durante o período foram realizados os testes para a obtenção do oleorresina em pó; determinados os teores de piperina em amostras de resina e grãos de pimenta; além da extração com acetona, álcool etílico, hexano e dicloroetano das cultivares Yaçará, Bragantina, Guajarina e Cingapura, coletadas nos campos experimentais de Belém e de Capitão Poço, do CPATU.

¹ Quím. Ind. M.Sc. EMBRAPA-CPATU. Caixa Postal 48, CEP 66.017-970. Belém, PA.

² Eng. Agr. M.Sc. EMBRAPA-CPATU.

³ Consultor da Japan International Cooperation Agency - JICA. Av. Nazaré 272, Sala 105. Ed. Clube de Engenharia, CEP 66.035-170. Belém, PA.

EXTRACTION AND CHARACTERIZATION OF BLACK PEPPER OIL AND OLEORESIN

Abstract: Diversification in other forms of using black pepper, obtaining essential oils and oily resin, which guarantee levels of piperine, elimination of salmonella contamination, product quality, price stability and added value, shall provide employment to a contingent of some 400,000 workers/day during harvest and promote stability to market prices. The advantages of commercializing other elaborated products instead of the raw materials, are obvious. In the case of processing black pepper to obtain oil and oleoresin, it will put local labor to work, as well as provide increased profit from industrialization. It will also enable a more rational use of the poorer quality product. Instead of being commercialized and exported at extremely low prices, they can be transformed into industrialized products of increased value, thereby opening new markets. The objective of the research is to extract and characterize the oil and oleoresin of certain cvs of black pepper, determining piperine levels their physical-chemical characteristics. Both in the laboratory and in the pilot- plant, extraction was carried out using water vapor. The resin fraction was extracted utilizing ethyl as solvent. The results obtained indicate low levels of resin and essential oil at the pilot- plant, which means that the extraction process must be optimized. The same will be repeated for the harvests of 1994 and 1995. During this period, tests were carried out to obtain oleoresin in powder, to determine the piperine levels in resin samples and pepper grains, besides extraction with acetone, ethyl alcohol, hexane and dichloridethane of cvs yaçará, bragantina, guajarina and singapore, collected on experimental fields at CPATU and at Capitão Poço.

Objetivo

Otimizar o processo de extração, em usina-piloto, do óleo essencial e da resina, de quatro cultivares de pimenta-do-reino, a fim de se obter produtos de alta qualidade para a utilização em indústrias de alimentos e de cosméticos.

Justificativa

O mercado mundial de pimenta-do-reino tem sido tradicionalmente instável, com marcantes flutuações de preço do produto, fato que determina freqüentes crises, ora por falta, ora por excesso de oferta.

A despeito do esforço por parte da comunidade internacional dos pipericultores, através da adoção de políticas adequadas, visando à estabilização dos mercados e dos preços, a pimenta-do-reino continua em crise.

Apesar das oscilações, principalmente de preços, que vêm ocorrendo no mercado mundial da pimenta-do-reino constatou-se, não obstante, uma contínua tendência de aumento de consumo da ordem de 4% nos últimos anos. Essa tendência, ao que tudo indica, deverá continuar.

O mercado interno brasileiro é relativamente pouco significativo, apresentando um dos mais baixos índices de consumo per-capita/ano. Enquanto o consumo nacional de pimenta-do-reino é da ordem de 3.500t/ano (30g per-capita/ano), nos Estados Unidos da América e na Europa Ocidental o consumo atinge valores acima de 150g de pimenta per-capita/ano.

A principal aplicação da pimenta-do-reino na forma de grãos (pimentas preta e branca) é feita na industrialização de alimentos, principalmente, na elaboração de embutidos e outras conservas de carnes, peixes e legumes, e como condimentos, tendo-se sempre o risco de contaminação por salmonela e outros agentes, em função dos métodos de beneficiamento.

A estabilidade do mercado, em benefício tanto de produtores como de consumidores torna-se, portanto, um imperativo e deverá, necessariamente, levar em consideração o potencial de produção que se deve ajustar, tanto quanto possível, à demanda, em cada caso. Para que os preços da pimenta no mercado internacional possam atender o real valor do produto é condição essencial que não haja excesso de oferta, o que só poderá ocorrer se forem encontradas outras alternativas de uso e aplicação, significando que, atendido o mercado, o eventual excesso de produção seria processado e comercializado na forma de produtos derivados ou outras formas alternativas de uso e aplicação. Aliás, alguns desses derivados e formas alternativas de uso e aplicação da pimenta são conhecidos.

Um derivado que já atingiu expressivo volume de consumo é a fração de oleorresina extraída da pimenta, por tratamento com solventes. Em 1980, o volume de oleorresina de pimenta produzido e consumido foi de 400 toneladas, sendo que a taxa de expansão do mercado de consumo nos últimos cinco anos foi de 4% ao ano.

A aplicação da fração de oleorresina é feita não só na indústria de alimentos, especialmente embutidos, mas também pode servir como matéria-prima para obtenção da fração de óleos essenciais (1% a 3%) com amplas possibilidades de uso na indústria de cosméticos.

Por outro lado, como as frações de óleo e de resina são imiscíveis em água e produtos de umidade intermediária, como embutidos, enlatados e outros, necessário se faz que haja transformação para uso na forma de pó, visando a uma melhor homogeneização do universo do produto final.

A necessidade de desenvolvimento de tecnologia agroindustrial, em função basicamente do aproveitamento da pimenta choca e do crescimento da demanda mundial, faz com que a busca de alternativas para aproveitamento da pimenta-do-reino assegure a continuidade de novos plantios e a manutenção dos existentes, independentemente das freqüentes oscilações de preço.

A entrada de novas cultivares no setor de produção faz com que se torne necessário o conhecimento dos teores de piperina, de modo a que se possa oferecer produtos de características definidas.

Resultados parciais

Experimento 1 - Extração do óleo essencial e da resina da pimenta-do-reino

O projeto, previsto para ser executado em três anos, foi efetivamente iniciado em novembro de 1992, com a instalação da usina-piloto destinada à extração de óleos essenciais e resinas (Figs. 59 e 60). Durante as safras de 1993 e 1994 foram coletadas amostras de pimenta-do-reino nos municípios paraenses de Santa Maria do Pará, Igarapé-Açu, Castanhal e Tomé-Açu. Após o beneficiamento de pós-colheita, procedeu-se a extração do óleo essencial dessas amostras, em laboratório, pelos processos de Coobação e em Usina-Piloto, através do arraste com vapor d'água. A separação do óleo da água foi efetuada por diferença de densidade e este desumidificado através de sulfato de sódio anidro.



FIG. 59 - Vista parcial da usina-piloto destacando-se o extrator de resina.



FIG. 60 - Vista parcial da usina-piloto destacando-se o extrator de óleo essencial.

Do resíduo resultante da extração do óleo essencial foi feita a extração da resina, também em usina-piloto, utilizando-se álcool etílico como solvente. O fluxograma apresentado na Fig. 61 e os dados das Tabelas 26, 27 e 28 mostram a metodologia utilizada no beneficiamento da pimenta, o rendimento em óleo essencial e resina, os teores de piperina e as extrações com solventes, respectivamente.

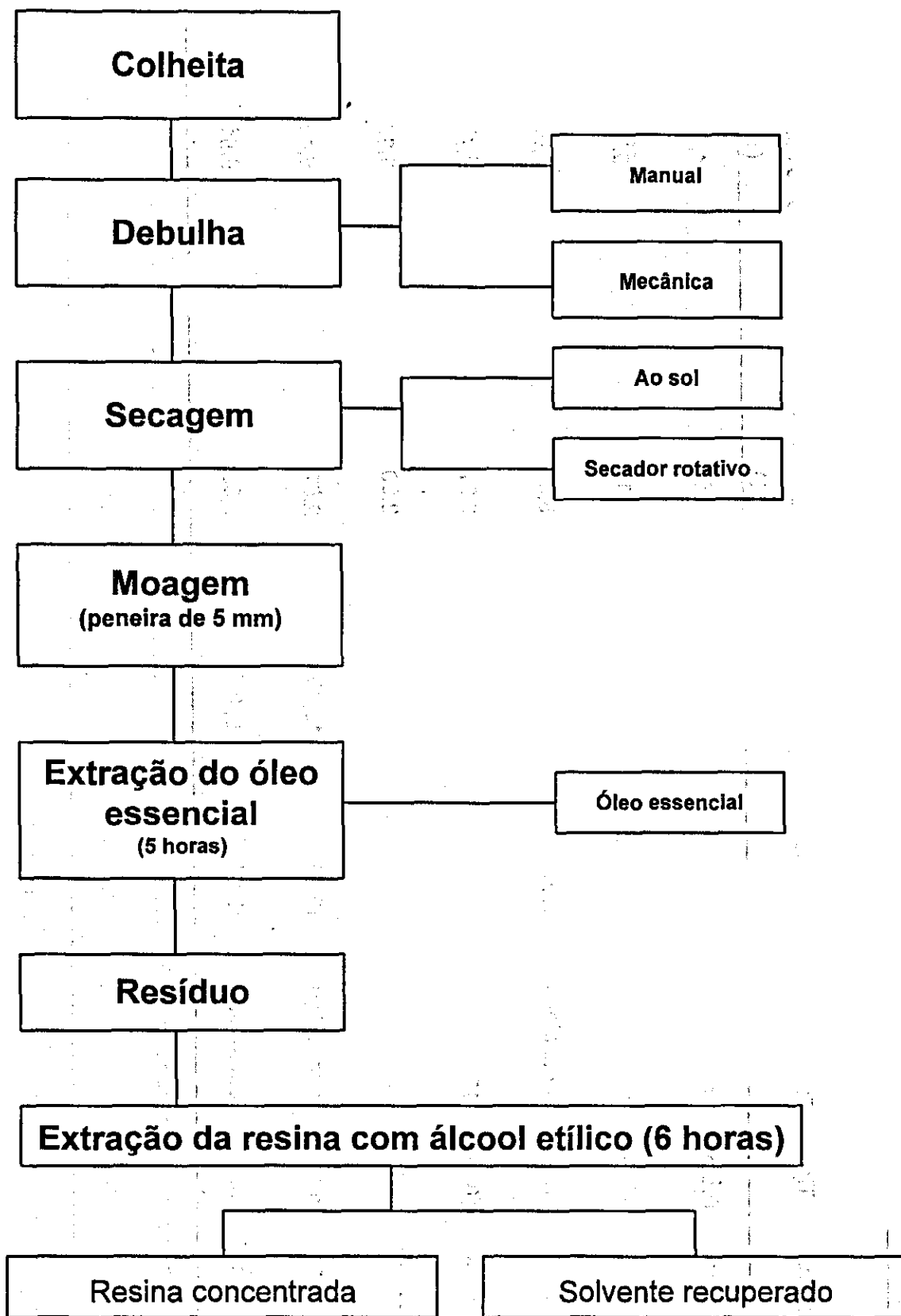


FIG. 61 - Fluxograma para extração de óleo essencial e de resina de pimenta-do-reino.

TABELA 26 - Médias dos rendimentos em óleo essencial e resina, de cultivares de pimenta-do-reino, extraídos em laboratório e usina-piloto nos anos de 1993 e 1994, em Belém, Pará.

Cultivar	Tipo	Procedência	Usina-piloto ¹			Laboratório ¹	
			Umidade (%)	Resina (%)	Óleo essencial (%)	Óleo essencial (%)	
Guajarina	Preta	Santa Maria	13,82	11,52	2,88	4,52	
Guajarina	Branca	Santa Maria	6,90	8,75	2,19	5,79	
Guajarina*	Preta	Santa Maria	17,66	11,80	5,64	7,66	
Cingapura	Preta	Igarapé-Açu	13,64	10,92	3,27	3,76	
Cingapura*	Preta	Castanhal	10,34	10,08	2,60	4,23	
Cingapura*	Preta	Igarapé-Açu	13,41	10,49	2,57	5,49	
Bragantina	Preta	Tomé-Açu	15,64	9,48	3,38	5,51	

*= Chocha; ¹=Valores corrigidos para 0% de umidade.

TABELA 27 - Teores de piperina em resina e grãos de pimenta-do-reino.

Produto	Cultivar	Procedência	Piperina (%)
Resina	Cingapura	Igarapé-Açu	35,24
Resina	Bragantina	Tomé-Açu	39,67
Grão	Cingapura	Igarapé-Açu	3,14
Grão	Cingapura	Capitão Poço	3,16
Grão	Bragantina	CPATU	3,52
Grão	Cingapura	CPATU	3,30
Grão	Iaçará	Capitão Poço	2,48
Grão	Cingapura-branca	Igarapé-Açu	3,99
Grão	Cingapura	Santa Maria	5,28
Grão	Cingapura-chocha	Igarapé-Açu	7,07

TABELA 28 - Resultados, em percentagem, das extrações com acetona, álcool etílico, hexano e dicloroetano, de algumas cultivares de pimenta-do-reino.

Cultivar	Procedência	Umidade	Acetona	Álcool	Hexano	Dicloroetano
laçará	CPATU	13,43	6,90	11,72	4,55	8,78
Bragantina	CPATU	12,95	7,60	10,46	4,37	8,67
Guajarina	CPATU	11,95	7,36	11,45	4,98	7,62
Cingapura	CPATU	12,43	7,01	12,41	4,60	6,87
laçará	Capitão Poço	13,84	7,31	9,22	5,25	7,36
Cingapura	Capitão Poço	12,81	6,76	9,51	4,83	7,55
Guajarina	Capitão Poço	13,82	9,55	12,26	6,90	8,97
Bragantina	Capitão Poço	13,25	7,37	9,38	5,32	6,06
Sta Maria	Cingapura	11,90	6,69	9,30	4,62	7,81
Guejarina	Santa Maria	12,32	6,61	9,16	5,42	7,83
Cingapura	Igarapé-Açu	12,40	10,40	12,89	6,46	11,07
Cingapura	Igarapé-Açu	12,29	6,97	9,91	3,81	6,11

* Valores corrigidos para 0% de umidade.

Com base nos resultados parciais contidos na Tabela 26, pode-se verificar que os teores de óleo essencial, determinados em laboratório, encontram-se dentro dos limites referidos na literatura, porém, são bastante superiores aos obtidos na usina-piloto, significando que devem ser feitos ajustes, no sentido de otimizar a extração. Os teores de resina obtidos na usina-piloto também podem ser mais elevados após esses ajustes.

Os resultados contidos na Tabela 27 são perfeitamente compatíveis com os encontrados na literatura e, os observados na Tabela 28, serão discutidos após as repetições com amostras referentes às safras de 1995.

Experimento 2 - Obtenção do oleorresina em pó

Esta ação de pesquisa recebeu, no período de 11 de novembro de 1994 a 10 de fevereiro de 1995, a consultoria de um pesquisador da Takasago Perfumary Co. Ltd. e, assim, o experimento pôde ser iniciado.

O oleorresina da pimenta-do-reino pode ser utilizado na forma como é obtido, porém, como as frações do óleo essencial e da resina são imiscíveis em água e produtos de umidade intermediária como embutidos, enlatados e outros, o produto poderá ser transformado em pó visando melhor homogeneização.

Com essa finalidade, dois testes foram realizados. O primeiro, denominado "Absorbed Powder", que consistiu na mistura simples do óleo essencial, resina, e malte dextrina, em quantidades previamente determinadas. Os melhores resultados foram encontrados na seguinte composição percentual: óleo essencial (2%), resina (2%) e malte dextrina (96%). No segundo teste, o óleo essencial e a resina foram secados em aparelho "spray dryer" usando-se malte dextrina como veículo, e goma arábica e/ou amidos de mandioca, milho e arroz como agentes emulsificantes.

Considerando-se as dificuldades de secagem, a viscosidade e a emulsificação, nos diversos ensaios realizados, a formulação que apresentou o melhor resultado foi: 15% de óleo essencial; 15% de resina; 40% de goma arábica; 30% de malte dextrina e mais 180ml de água.

Os resultados comparativos entre os dois processos são apresentados a seguir.

Absorbed Powder:

- O pó é obtido em aproximadamente uma hora
- O custo do processo é baixo
- O teor máximo de óleo é de 5%
- O óleo oxida rapidamente e, conseqüentemente, o produto é instável

Secagem em "spray dryer":

- O pó é obtido em aproximadamente três horas
- O custo do processo é alto
- O teor de óleo varia de 20% a 30%
- A oxidação do óleo é muito lenta e, conseqüentemente, o produto é estável

Experimento 3 - Utilização, em indústrias brasileiras de alimentos e de cosméticos, do oleorresina e do óleo essencial

A utilização do óleo essencial e do oleorresina em indústrias de cosméticos e de alimentos, deverá ser iniciada em 1996.

Conclusões preliminares

Os rendimentos obtidos na extração do óleo essencial e da resina da pimenta-do-reino podem ser otimizados, permitindo o aumento percentual dos teores, indicando maior viabilidade para o uso do tipo preta chocha.

Os teores de óleo e resina da pimenta-do-reino obtidos nesta pesquisa não diferem dos encontrados na literatura internacional, evidenciando, portanto, possibilidades de atender ao mercado interno e participar do externo.

Os teores de piperina determinados na resina e nos grãos permitem indicar o álcool etílico como substituto do dicloroetano e acetona, solventes comumente utilizados, e com a vantagem de ser produzido em larga escala no Brasil a baixo custo.

O oleorresina (mistura do óleo essencial com resina) vem sendo utilizado na forma em que é obtido, ou seja, um líquido viscoso de coloração verde-oliva a verde-escuro. Existe a possibilidade de ser transformado em pó, o que permite melhor homogeneização com produtos de umidade intermediária.

O oleorresina em pó, na forma de "absorbed power", implica na utilização imediata do produto, enquanto que o obtido em "spray dryer" apresenta-se bem mais estável. Contudo, a goma arábica, utilizada como agente emulsificante deverá ser substituída por outro produto, devido ao elevado preço no mercado.

Difusão de tecnologia

- Apresentação de trabalho no Workshop "Geração de Tecnologia Agroindustrial para o Trópico Úmido". Convênio CPATU/JICA. Março de 1994: "Extração do óleo e do oleorresina da pimenta-do-reino" em Belém, PA".

- Atendimento a produtores da Cooperativa Agrícola Mista de Tomé-Açu, em 1994.

- EMBRAPA gera tecnologia com cooperação técnica do Japão - entrevista concedida ao jornal "O Liberal", de 6 de abril de 1994.

- Palestra para pesquisadores do CPATU em 1994 e 1995.

- Artigo sobre tecnologia da pimenta-do-reino na série coleção plantar, da EMBRAPA em 1995.

- Cursos para professores e alunos da Escola Agroindustrial Juscelino Kubitschek em 1995.

- Informações prestadas a professores da UFPA e FCAP.

COMPORTAMENTO DE GERMOPLASMA DE PIMENTA-DO-REINO EM RELAÇÃO À PRODUTIVIDADE E RESISTÊNCIA A DOENÇAS EM REGIÕES DA AMAZÔNIA BRASILEIRA

Fernando Carneiro de Albuquerque¹

Maria de Lourdes Reis Duarte²

Ângela Maria Leite Nunes¹

Ruth Linda Benchimol Stein¹

Marli Costa Poltronieri¹

Raimundo Parente de Oliveira¹

Resumo: Com a finalidade de obter novas cultivares de pimenta-do-reino, para exploração comercial na região, foram testados doze genótipos durante seis anos consecutivos nos municípios de Tomé-Açu, Castanhal e Capitão Poço, tradicionais produtores de pimenta-do-reino no Estado do Pará. Considerando a produtividade e os índices de infecção de fusariose, foram avaliadas as cultivares Kottanadan 1 e 2, laçará 1 e 2, Kuthiravally, Apra, Cingapura, Chumala, Perumkodi, Bragantina e Guajarina. A cultivar Cingapura foi utilizada como referência, devido ser a mais explorada na região, há mais de 40 anos. Para avaliação foram instalados experimentos de campo, em blocos casualizados com três repetições. Os resultados obtidos durante cinco anos indicaram que as cultivares Kottanadan-1, Kuthiravally e Apra, apesar de suscetíveis à fusariose, apresentaram produtividade mais elevadas, em kg/ha de pimenta preta, independente da localidade. No entanto, a maturação tardia dos frutos, além da suscetibilidade à fusariose, tem dificultado a aceitação dessas cultivares por parte dos produtores rurais. Para estudo da genética do patógeno *Nectria haematococca* f.sp. *piperis* (*Fusarium solani* f.sp. *piperis*) foram desenvolvidos trabalhos de pareamento de culturas monospóricas de ascósporos e de macroconídios. Detectou-se que a maioria dos isolamentos que ocorrem, em condições ambientais naturais, é hermafrodita e alguns masculinos. Não foram encontrados isolamentos femininos. Os fatores de compatibilidade heterotática encontram-se bem distribuídos na população do fungo. Foram determinadas algumas espécies de *Piper* hospedeiras desse fungo. Os ensaios de enxertia, em espécies nativas de *Piper* demonstraram que algumas dessas espécies poderiam oferecer vantagens na conservação de genótipos de pimenta-do-reino, considerando a rusticidade e a tolerância à fusariose, da planta porta-enxerto.

¹ Eng. Agr. M.Sc. EMBRAPA - CPATU. Caixa Postal 48, CEP 66.017-970. Belém, PA.

² Eng. Agr. Ph.D. EMBRAPA - CPATU.

BEHAVIOR OF BLACK PEPPER GERMPLASM IN TERMS OF PRODUCTIVITY AND RESISTANCE TO DISEASES IN REGIONS OF BRAZILIAN AMAZONIA

Abstract: With the aim of obtaining new cultivars of black pepper for commercial use in the region, we tested twelve genotypes over a period of six consecutive years in the municipalities of Tomé-Açu, Castanhal and Capitão Poço, traditional black pepper production regions in the state of Pará. We tested cvs. Kottanadan 1 and 2, Iaçará 1 and 2, Kuthiravally, Apra, Singapore, Chumala, Perumkodi, Bragantina and Guajarina for productivity and rates of fusariose infection. Cv. Singapore was used as a reference, for being the most cultivated in the region for over forty years. Field experiments were conducted to evaluate those cultivars, in randomized blocks with three replications. The results of more than five years study showed that cvs. Kottanadan-1, Kuthiravally and Apra, although susceptible to fusariose, have the highest yields, in kg/ha of black pepper, regardless of location. Notwithstanding, this susceptibility combined with their late fruit ripeness make these unpopular to local farmers. Single ascospore culture were crossed reciprocally to study the genetics of the pathogen *Nectria haematococca f.sp. piperis* (*Fusarium solani f.sp. piperis*). To date, it has been detected that most isolates occurring under natural conditions, are hermaphrodites with some males. No female isolates have yet been isolated. Heterothallic compatibility is well distributed throughout the fungus populations.

Objetivo

Este projeto tem como objetivos selecionar cultivares de pimenta-do-reino adequadas à exploração comercial no Estado do Pará; determinar isolamentos de *Nectria haematococca f.sp. piperis* quanto às características de patogenicidade, sexualidade e compatibilidade heterotática e avaliar a compatibilidade por enxertia, entre espécies nativas de *Piper* com a pimenta-do-reino, visando à conservação de germoplasma dessa espécie.

Justificativa

A cultura da pimenta-do-reino é importante na economia do Estado do Pará, por ser um produto de exportação. O Brasil tem ocupado o quarto lugar entre os principais produtores dessa piperácea, com uma produção que varia de 20 a 30 mil toneladas por ano, sendo que a demanda mundial é de cerca de 150 mil toneladas. Devido à ocorrência de doenças severas, entre as quais destaca-se a fusariose, e ao aumento de insumos e de mão-de-obra, o custo de produção no Brasil vem se tornando muito elevado, para compensar, economicamente, o produto final para exportação. Torna-se necessário desenvolver tecnologias visando o aumento da produtividade ou da lucratividade. A obtenção de cultivares mais produtivas, com característica de tolerância à fusariose, constituiria em tecnologia das mais importantes para que o Brasil continue a concorrer no mercado externo.

O aumento da variabilidade genética da pimenta-do-reino poderá possibilitar o desenvolvimento de novos sistemas de produção, principalmente, envolvendo consórcios, para tornar a exploração da área mais lucrativa. A fusariose, no Estado do Pará, é um dos problemas mais sérios para a cultura, tendo concorrido para a redução da área cultivada e da produtividade, onde a produção brasileira chegou a atingir de 30 a 40 mil toneladas na década de 80. Atualmente, o produtor brasileiro recebe por quilo de pimenta preta cerca de US\$ 1,20, o que é insuficiente para as despesas de manutenção da área cultivada, colheita e preparo do tipo de pimenta para comercialização.

O conhecimento mais profundo da biologia do patógeno tem concorrido para a seleção de medidas mais adequadas para o controle de doenças de importância econômica em várias culturas. Além disso, estudos com fungos patogênicos têm contribuído para o desenvolvimento da micologia e de trabalhos de importância científica como o preparo de teses. As regiões do trópico úmido apresentam diversidade de espécies nativas de *Piper*, mas pouco tem sido feito para o aproveitamento dessas espécies no melhoramento da cultura da pimenta-do-reino. Os trabalhos visando avaliar a compatibilidade, por enxertia, dessas espécies com a pimenta-do-reino, poderão contribuir para a manutenção mais adequada de genótipos desta espécie, em área de ocorrência de fusariose.

Resultados parciais

Experimento 1 - Comportamento de germoplasma de pimenta-do-reino em áreas de ocorrência de fusariose

Foram instalados ensaios para avaliação de cultivares de pimenta-do-reino nos municípios de Castanhal, Tomé-Açu e Capitão Poço, PA. Estão sendo obtidos, anualmente, dados de produtividade e de incidência de fusariose. Os ensaios foram instalados em blocos ao acaso, com dez pimenteiros úteis por parcela, testando doze cultivares. Adotou-se o plantio em fileiras duplas, colocando-se os tutores em posições divergentes, de maneira a estabelecer um sistema de plantio triangular. As pimenteiros são conduzidas em tutores mortos de madeira de boa qualidade e de longa durabilidade, com 2,5m a 3,0m de altura.

Foram feitas comparações dos resultados obtidos nas diferentes áreas produtoras. Analisaram-se os dados obtidos até 1992 em Castanhal, onde o ensaio foi localizado no meio de um pimental comercial com 25 mil pimenteiros. A incidência da doença foi maior devido à elevada concentração da população do hospedeiro e, conseqüentemente, ao aumento do nível de esporulação do patógeno, após desenvolvimento das fontes de infecção primárias. Em Tomé-Açu e Capitão Poço os ensaios foram instalados em áreas isoladas de outros plantios de pimenta-do-reino.

Devido à menor quantidade de fontes de infecções primárias, a propagação da doença tem sido mais lenta do que a evolução das infecções ocorridas em Castanhal, durante o ciclo de produtividade de cinco anos. Embora tenham ocorrido percentagens elevadas de perdas de pimenteiros devido à fusariose, as coletas de dados de produtividade e de incidência da doença, continuaram sendo feitas no período de 1993/1994.

A incidência da doença foi mais severa no experimento instalado em Castanhal, onde os níveis de concentrações de inóculo tornaram-se elevados, devido à maior população de hospedeiro, cerca de 30 mil pimenteiros em volta da área experimental. Nos ensaios de Tomé-Açu e Capitão Poço, instalados em áreas isoladas de outros plantios de pimenta-do-reino, as percentagens de plantas mortas por fusariose foram menos acentuadas. Os resultados indicaram

que todas as cultivares são suscetíveis à doença causada pelo fungo *Fusarium solani* f. sp. *piperis*, em condições de campo. Em área muito infestada, como a do experimento de Castanhal, verificou-se que, a partir de quatro anos de idade, as cultivares Kuching e Kottanadan-2, foram as mais atingidas pela doença (Tabela 29). Nos ensaios isolados de Tomé-Açu e Capitão Poço não foram observadas diferenças significativas entre as suscetibilidades das cultivares (Tabela 30).

TABELA 29 - Percentagem de plantas mortas por fusariose (ppmf) no município de Castanhal - plantio: março de 1985.

Cultivar	ppmf (%)				
	1986	1987	1988	1989	1990
Iaçará-2	10,00 a	30,00 a	30,00 b c	35,00 b c	50,00 a
Apra	5,00 a	30,00 a	35,00 b c	50,00 a b c	55,00 a
Cingapura	0,00 a	10,00 a	35,00 b	50,00 a b c	50,00 a
Guajarina	0,00 a	15,00 a	25,00 c	45,00 a b c	60,00 a
Iaçará-1	0,00 a	10,00 a	20,00 c	20,00 c	30,00 a
Brangantina	0,00 a	15,00 a	25,00 c	40,00 a b c	50,00 a
Karimunda	0,00 a	10,00 a	40,00 b c	40,00 a b c	55,00 a
Kottanadan-1	0,00 a	20,00 a	25,00 c	25,00 b c	45,00 a
Kottanadan-2	0,00 a	40,00 a	70,00 a b	80,00 a b	85,00 a
Kuching	0,00 a	45,00 a	90,00 a	95,00 a	95,00 a
Kuthiravally	0,00 a	25,00 a	35,00 b c	50,00 a b c	60,00 a

TABELA 30 - Percentagens de pimenteiras mortas por fusariose (ppmf) nos municípios de Tomé-Açu e Capitão Poço - plantio: março de 1987.

Cultivar	ppmf (%)					
	Capitão Poço			Tomé-Açu		
	1990	1991	1992	1990	1991	1992
Guajarina	6,67 a	10,00 a	20,00 a	3,33 a	10,00 a	26,66 a
Iaçará-1	3,33 a	3,33 a	10,00 a	0,00 a	10,00 a	13,33 a
Cingapura	3,33 a	3,33 a	10,00 a	0,00 a	3,33 a	10,00 a
Kottanadan-1	3,33 a	16,67 a	33,33 a	0,00 a	13,33 a	20,00 a
Bragantina	0,00 a	0,00 a	6,67 a	0,00 a	3,33 a	13,33 a
Iaçará-2	0,00 a	6,67 a	20,00 a	6,67 a	13,33 a	20,00 a
Karimunda	0,00 a	3,33 a	16,11 a	0,00 a	6,67 a	20,00 a
Apra	0,00 a	6,67 a	126,22 a	0,00 a	3,33 a	10,00 a
Kottanadan-2	0,00 a	23,33 a	33,33 a	0,00 a	16,67 a	20,00 a
Kuching	0,00 a	16,67 a	30,00 a	-	-	-
Kuthiravally	0,00 a	16,67 a	26,66 a	0,00 a	13,33 a	23,33 a
Perumkodi	0,00 a	0,00 a	10,00 a	0,00 a	3,33 a	26,66 a
Chumala	-	-	-	0,00 a	10,00 a	10,00 a

Em todos os experimentos, as cultivares Kottanadan-1, Kuthiravally e Apra destacaram-se em produtividade de pimenta preta por hectare, mesmo em Castanhal, onde ocorreram epidemias severas da fusariose (Figs. 62 e 63).

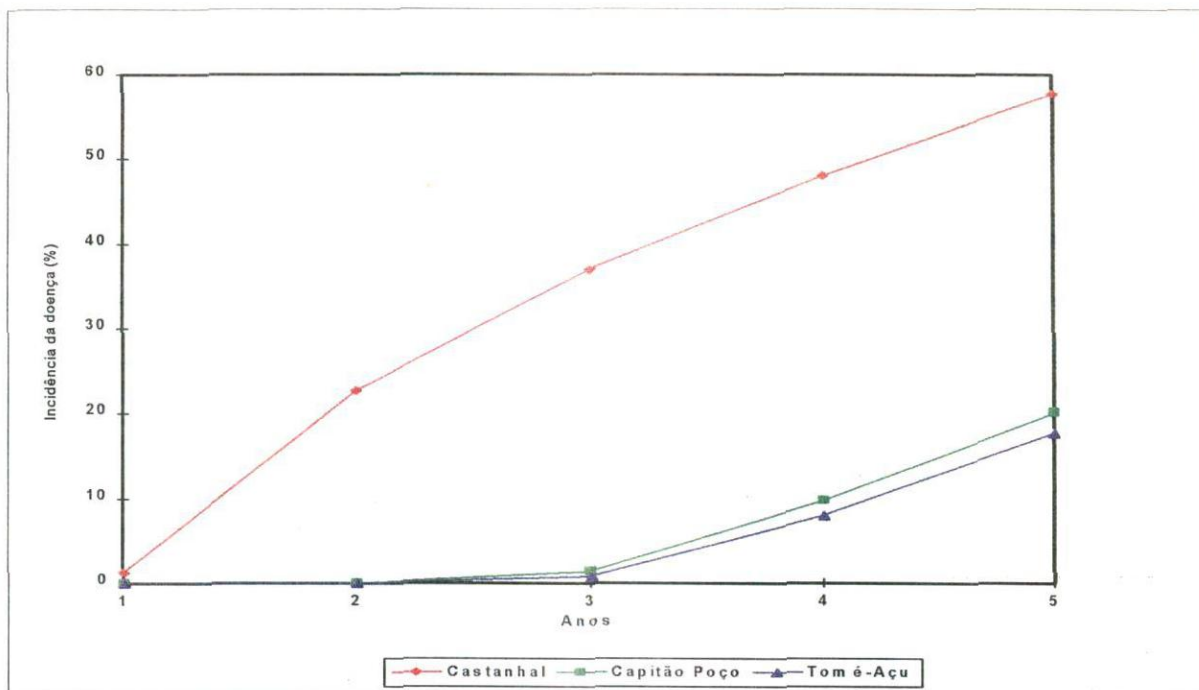


FIG. 62 - Plantas de pimenta-do-reino mortas por fusariose ao longo dos anos.

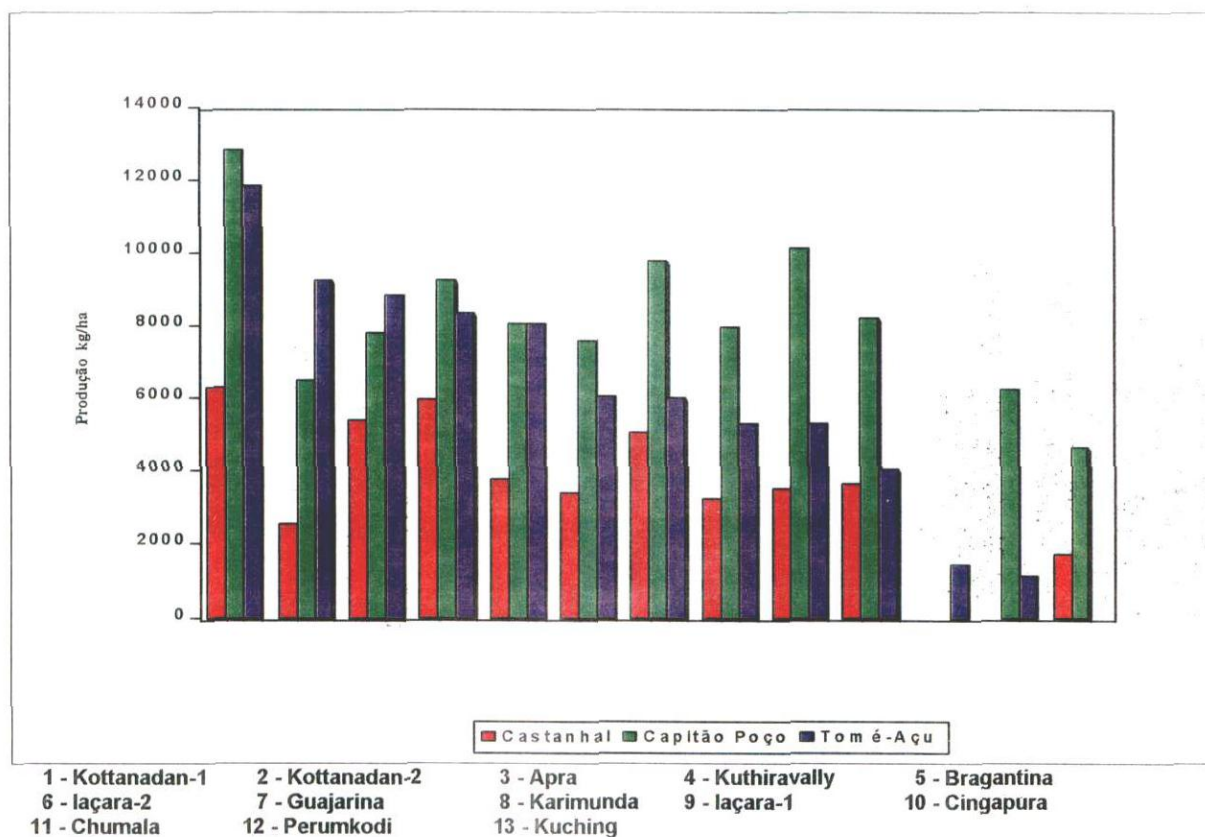


FIG. 63 - Produtividade de cultivares de pimenta-do-reino durante cinco anos de produção.

A fusariose tem se desenvolvido em pimenteiras espalhadas em diferentes pontos dos ensaios. A partir dessas fontes primárias de infecção, os esporos do patógeno têm se disseminado para pimenteiras vizinhas. Devido à elevada incidência da doença, o ensaio de Castanhal foi encerrado no quinto ano, quando a maioria das cultivares apresentava mais de 60% de incidência da doença. Nos ensaios isolados de Tomé-Açu e Capitão Poço, parcelas de pimenteiras com seis anos de idade, de cultivares de elevada produtividade, ainda apresentavam desenvolvimento vigoroso (Fig. 64).



FIG. 64 - Parcela da cultivar Kottanadan-1 aos seis anos de idade, no município de Tomé-Açu, PA.

A análise conjunta dos resultados dos ensaios realizados nos três municípios demonstrou que as cultivares Kottanadan-1, Kuthiravally e Apra, foram as mais produtivas em kg/ha de pimenta preta (Tabela 31).

TABELA 31 - Análise conjunta da produtividade de pimenta preta de treze cultivares de pimenta-do-reino, nos municípios de Castanhal, Tomé-Açu e Capitão Poço, durante cinco anos.

Cultivar	Produtividade média (kg/ha)
Kotanadan-1	10.779,90 a
Kuthiravally	8.064,61 a b
Apra	7.575,84 a b
Guajarina	7.183,22 b c
Bragantina	6.973,76 b c d
Iaçar-1	6.654,68 b c d
Kottanadan-2	6.520,50 b c d
Iaçar-2	5.959,80 b c d
Karimunda	5.778,09 b c d
Cingapura	5.506,34 b c d
Perumkodi	3.692,74 c d e
Kuching	3.449,17 d e
Chumala	1.436,04 e

*Médias de cinco repetições.

No período de 1993 a 1995, os índices de infecções de fusariose aumentaram em algumas cultivares. No entanto, ocorreram diferenças entre os índices dos dois municípios, provavelmente, devido às condições irregulares de distribuição da quantidade de inóculos, durante os períodos adequados para o estabelecimento das infecções.

Em Tomé-Açu, as cultivares mais infectadas nesse período foram Guajarina, Kuthiravally, Apra, Karimunda e Perumkode; em Capitão Poço, os maiores índices de suscetibilidade ocorreram nas cultivares Kottanadan-2, Apra e Kuthiravally. Embora a incidência da doença tenha evoluído, as cultivares Kottanadan-1 e Kuthiravally continuaram apresentando produtividade mais elevadas. Verificou-se ligeira queda de produção na cultivar Apra, porém ficou situada entre as mais produtivas. Destacaram-se também em produtividade as cultivares Bragantina, Guajarina e Iaçar-1, em Tomé-Açu; e Cingapura, Guajarina e Karimunda, em Capitão Poço (Tabela 32).

TABELA 32 - Produtividade e incidência de fusariose em cultivares de pimenta-do-reino nos ensaios de dois municípios do Estado do Pará em 1993 e 1994.

Cultivar	Municípios							
	Tomé-Açu				Capitão Poço			
	1993		1994		1993		1994	
	Pimenta preta (kg/ha)	Fusariose (%)	Pimenta preta (kg/ha)	Fusariose (%)	Pimenta preta (kg/ha)	Fusariose (%)	Pimenta preta (kg/ha)	Fusariose (%)
Cingapura	947,6	10,0	1431,3	16,6	1577,3	20,0	1269,3	26,6
Bragantina	1172,9	20,0	1433,8	23,3	3413,0	13,3	1162,6	16,6
Guajarina	696,6	26,6	1425,2	36,6	2392,0	23,3	1701,3	30,0
Kottanadan-1	2407,3	20,0	2235,0	26,6	2960,0	33,3	2280,0	40,0
Kottanadan-2	1698,4	20,0	2354,4	20,0	2436,0	46,6	2070,6	50,0
laçará-1	840,6	13,3	1641,8	13,3	2797,0	13,3	2204,0	13,3
laçará-2	1046,1	23,3	1080,6	30,0	1462,6	16,6	1502,6	23,3
Kuthiravalli	2235,0	23,3	1041,8	26,6	2629,3	26,6	1933,3	26,6
Apra	1136,0	13,3	1937,2	16,6	1750,6	33,3	1621,3	46,6
Karimunda	276,9	20,0	360,6	40,0	1401,3	16,6	1477,3	23,3
Perumkodi	61,5	33,3	71,3	40,0	1329,3	6,0	794,6	10,0
Chumala	51,6	10,0	444,3	20,0	-	-	-	-
Kuching	-	-	-	-	887,3	36,6	784,0	43,3

Data do plantio: fevereiro e março de 1987; Avaliação: julho a outubro de 1993 e 1994

Com base nos dados de produtividade, obtidos no período de 1993 a 1994, as cultivares Kottanadan-1, Kuthiravally e Apra continuaram destacando-se das demais. No ensaio de Capitão Poço, em 1994, a cultivar Karimunda apresentou índice de produtividade mais elevado do que nos anos anteriores.

Em condições de índices elevados de fusariose, ocorridos em Castanhal, no terceiro e quarto anos de produção, essas cultivares continuaram a manter níveis de produtividade por hectare, superiores ao da cultivar Cingapura, tradicional na região. Porém, ainda não foram bem aceitas pelos produtores regionais, provavelmente, por apresentarem maturação tardia e propagação mais difícil do que a Cingapura. Torna-se necessário desenvolver e acompanhar unidades de observação e/ou demonstração, com plantios em áreas maiores para estabelecer, de maneira mais segura, o comportamento dessas cultivares em culturas com finalidade comercial. Devem ser mais adequadas para pequenos e médios produtores em sistemas consorciados com outras culturas, principalmente em épocas em que os preços de comercialização possibilitem melhor convivência da cultura com a fusariose.

De acordo com os dados disponíveis, pode ser recomendada a utilização dessas cultivares em programas de melhoramento e para a seleção de novos sistemas de produção de pimenta-do-reino no ambiente regional, tais como a utilização de sombreamento e condução em tutor vivo, a redução da área explorada pelo produtor e o desenvolvimento de formulações de fertilizantes mais adequados para cada cultivar, com vistas à redução dos índices de infecção causada pelo fungo *Nectria haematococca* (*Fusarium solani* f.sp. *pirenis*).

Das pimenteiras infectadas com sintomas da doença coletaram-se amostras para análise de laboratório. Das partes infectadas do caule (Fig. 65) e das raízes, foi isolada com frequência a forma de *Fusarium solani* patogênica à pimenta-do-reino.



FIG. 65 - Sintomas de secamento de ramos da pimenteira-do-reino causados por fusariose.

Das amostras com estruturas do estágio perfeito *Nectria haematococca* f.sp. *piperis*) (Fig. 66), foram obtidas culturas purificadas com capacidade de produzir peritécios e ascósporos em meio de cultura. A partir dessas culturas com estrutura do estágio perfeito, poderão ser executados experimentos para caracterização da genética e da patogenicidade de isolamentos de *N. haematococca* f.sp. *piperis*, tendo em vista que as populações compatíveis quanto à sexualidade e a fatores de compatibilidade ("Mating types") não estão bem

estabelecidas. Para um estudo mais criterioso do fungo, torna-se necessário estabelecer uma proposição de ação ou projeto de pesquisa, incluindo objetivo, metas, hipóteses científicas, materiais e métodos e cronograma de execução.



FIG. 66 - Peritécios de *Nectria haematococca* f.sp. *piperis*, formados na região do nó, após a necrose dos tecidos.

No período de 1993 a 1995 de porções infectadas do caule e raízes continuaram a ser obtidas culturas purificadas de *N. haematococca* f.sp. *piperis*. De uma cultura em que ocorreu produção de peritécios férteis isolada de pimenteira, coletada no município de Ipixuna, obtiveram-se culturas monoascospóricas e monoconidiais em meios de batata-dextrose-agar (BDA) e batata-sacarose-agar (BSA). Mantidas em condições de regime de luz com periodicidade de 12 horas e temperatura de 25°C, durante 20 dias, não produziram frutificações férteis do estágio teleomórfico, como as culturas matrizes. Através de cruzamentos ou pareamentos de 30 isolados obtidos, nas combinações possíveis, foram separados quatro hermafroditas e um masculino. Das culturas hermafroditas, três possuíam o fator de compatibilidade (-) e um o fator (+). Na cultura masculina determinou-se o fator (+). Após a realização dos ensaios de cruzamentos, as culturas foram mantidas em condições adequadas para desenvolvimento de peritécios, ou seja, periodicidade de 12 horas de luz e temperatura de 25°C. No caso de fatores opostos e sexualidade adequados à fertilização, os peritécios começaram a se desenvolver com oito a quinze dias após o início dos ensaios.

Dispondo-se de isolamentos com sexualidade e fatores de compatibilidade identificados, conta-se com um elemento auxiliar para a identificação mais segura de outros isolamentos do fungo *N. haematococca* f.sp. *piperis*. Dessa maneira, comprovou-se, através de cruzamentos obtidos de pimenta-do-reino e de *Piper aduncum*, que essa espécie é hospedeira nativa dessa forma de *N. haematococca* patogênica à pimenta-do-reino.

De amostras da cultivar Guajarina coletadas em Tomé-Açu, foram obtidas culturas de nova espécie de *Fusarium*, que apresenta características de *F. oxysporum*. Estão sendo desenvolvidos trabalhos para determinar a capacidade fitopatogênica em pimenta-do-reino e a identificação específica adequada desse fungo.

Experimento 2 - Obtenção de mutantes de pimenta-do-reino resistentes à fusariose através da radiação gama

Estacas de pimenta-do-reino da cultivar Cingapura foram irradiadas com 7,5kr e 3,0kr de radiação gama na fonte de 60 Co. Após a obtenção das mudas, estas foram transplantadas para local definitivo em solo recém-desmatado no Campo Experimental do INATAM, no município de Tomé-Açu. As plantas matrizes foram conduzidas através de podas anuais, com o objetivo de estimular a brotação das gemas laterais para aumentar a possibilidade da obtenção de um setor homogêneo na quimera formada.

Após algumas podas obtiveram-se estacas de terceira ramificação (vM3) de plantas matrizes, que foram inoculadas com *Fusarium solani* f.sp. *piperis*.

Após as avaliações no campo foram selecionadas plantas que apresentaram maior nível de resistência ao patógeno. Estas plantas, após multiplicação e preparo de mudas, foram transplantadas para o campo em área da Cooperativa Agrícola Mista de Tomé-Açu (CAMTA) com o objetivo de serem feitas novas avaliações para resistência à fusariose e observações em relação às características agronômicas.

Estas plantas foram avaliadas por um período de quatro anos. Na Tabela 33 estão apresentados os dados de avaliação em relação à produção, vigor, resistência à fusariose e à seca.

TABELA 33 - Avaliação e caracterização de plantas provenientes de irradiação gama (M3).

Tratamento (planta)	Incidência à fusariose*	Formato e vigor da planta**	Resistência à seca***	Produção média (g)
5	x	x	x	-
25	1	1	2	4.766,7
26	2	2	3	2.222,2
27	1	1	2	9.366,7
45	2	2	2	1.500,0
46	2	2	2	2.500,0
48	2	2	2	1.950,0
69	2	2	2	1.866,7
70	2	2	2	2.000,0
72	2	2	2	4.333,3
90	3	3	1	4.333,3
103	2	2	2	800,0
106	1	1	1	1.533,3
108	2	2	2	2.316,7
121	2	2	2	3.133,3
122	1	1	2	2.566,5
123	2	2	2	4.666,7
132	3	3	2	583,3
133	3	3	3	0,0
135	2	2	2	3.066,7
136	2	2	2	1.933,3
137	2	2	2	3.033,3
148	1	1	1	633,3
157	2	2	2	1.633,3
163	1	1	2	116,7
166	1	1	1	1.933,3
170	2	2	2	2.000,0
T	2	2	1	1.566,7
Matriz "A"	x	x	x	-
Matriz "B"	2	2	1	733,3

Obs.: As avaliações em relação à ocorrência de fusariose, formato, vigor e resistência de plantas à seca foram feitas seguindo-se os seguintes sistemas de notas.

* - Incidência à fusariose: 1-Baixa 2-Moderada 3-Alta

** - Quanto à forma e vigor: 1-Ótima 2-Bom 3-Regular

*** - Resistência à seca: 1-Alta 2-Moderada 3-Baixa

O experimento encontra-se em fase de novas avaliações, após multiplicação vegetativa de plantas com caracteres desejáveis em relação à produção e resistência à fusariose, as quais foram plantadas em fevereiro de 1994, em área de produtor em Tomé-Açu. Deverão ser acompanhados, periodicamente, a fim de se obter dados de incidência de doença e produtividade para seleções definitivas. Os ensaios foram instalados a partir de estacas dos sete mutantes mais promissores quanto às características desejáveis.

Os solos das áreas experimentais encontravam-se naturalmente infestados com esporos do fungo *N. haematococca f.sp. piperis* agente etiológico da fusariose da pimenta-do-reino. Numa das propriedades, várias mudas, em algumas manchas de solo, morreram devido à excessiva retenção de água no solo. Em ambas as propriedades, as pimenteiras atingiram a idade de dois anos e a fusariose não ocorreu em nenhuma pimenteira. É esperado que a doença comece a se desenvolver após a primeira produção, quando poderão ser feitas avaliações iniciais quanto à tolerância dos diferentes genótipos.

Experimento 3 - Conservação de germoplasma de *Piper nigrum* através da enxertia em *Piper colubrinum*

Neste sistema utilizou-se a *P. colubrinum* como porta-enxerto, por apresentar resistência à fusariose, evitando a infecção do sistema radicular pela doença. Na parte aérea, o controle foi feito através de aplicações de produtos químicos. Como os solos da área do CPATU encontram-se infestados de *Fusarium solani f.sp. piperis*, a técnica de enxertia pode funcionar como elemento auxiliar na conservação, propagação e enriquecimento do BGPR. Estão sendo formadas coleções pequenas em canteiros de 10 x 1,5m. Nos primeiros canteiros instalados em março de 1992, obtiveram-se dados de crescimento e produção de estacas sadias de pimenta-do-reino obtidas de matrizes enxertadas de nove acessos (Tabela 34).

TABELA 34 - Desenvolvimento vegetativo e produção de estacas de acessos de pimenteiras enxertadas em *Piper colubrinum*.

Acesso	Média de crescimento		Número médio		
	Altura (cm)	Largura (cm)	Ramos ortotrópicos	Ramos plagiotrópicos	Estacas de dois nós
Karimunda	250	58,3	1,3	12	22
Bragantina	193,6	34	1,3	7,3	16,6
Djambi	247,6	54,3	2,3	21,6	23,3
Belantung	213,6	44	1	8,6	18,6
Clone S.1	249,3	44,6	1,3	26,3	23,6
Cingapura	149,6	28,6	1	7,3	14
Cing/Colch.	250	58,3	1,6	24,6	25
Kuthiravally	250	45	1,6	18	25
Chumala	244,3	45,3	1,3	11,3	19
Data do plantio: 09/03/92			Poda: 03/93		
Avaliação desenvolvimento: 05/02/93					

Estão sendo obtidos dados relacionados com a ocorrência de doenças e com o desenvolvimento dos ramos de crescimento visando à obtenção de maior número de estacas de propagação sadia de dois nós. Apenas uma matriz do acesso Djambi foi infectada pela fusariose aérea.

Deverão ser avaliadas outras espécies nativas como porta-enxertos, como a *P. aduncum*.

Foram realizadas coletas de outras espécies de *Piper* nativas, num total de quinze espécimens, visando à formação de uma coleção viva com identificação correta, avaliação da compatibilidade com a pimenta-do-reino e determinação das relações com a *Nectria haematococca*. Nos canteiros para testes de novos acessos vem ocorrendo ataque de uma espécie de cochonilha branca, do gênero *Pseudococcus*, que infesta as raízes de *P. colubrinum*, prejudicando o desenvolvimento ou matando a planta. Está sendo avaliado o controle com aplicações de carbofuran granulado, em volta do pé da planta.

Foram realizados ensaios iniciais para avaliar a possibilidade de utilização de outras espécies de *Piper* como porta-enxerto. As espécies de *Piper aduncum* e *Piper hispidum* apresentaram compatibilidade inicial com os acessos: Içará-1, Karimunda, Apra, Guajarina, Kottanadan-1. Os ensaios devem ser ampliados, para avaliar o comportamento das pimenteiras enxertadas no campo e o desenvolvimento vegetativo de outros acessos enxertados nesses porta-enxertos, visando à produção de estacas de propagação. O objetivo é utilizar a rusticidade e tolerância à doença, das espécies nativas, para a manutenção de genótipos em solos explorados com a cultura.

Conclusões preliminares

Os resultados obtidos, embora não sejam de caráter definitivo, possibilitaram tirar algumas conclusões:

As cultivares mais produtivas, em ciclo de cinco anos de avaliação da produção de pimenta preta foram a Kottanadan-1, Kuthiravally e Apra.

Todas as cultivares testadas foram suscetíveis à fusariose; os índices de incidência da doença aumentaram após o terceiro ano de produção.

Algumas espécies nativas de *Piper*, como a *P. aduncum* e *P. colubrinum* vêm apresentando compatibilidade parcial, por enxertia, com a pimenta-do-reino, o que constitui indicação de que poderão ser utilizadas como porta-enxertos para a conservação de genótipos de *P. nigrum*, em área de ocorrência de fusariose.

Difusão de tecnologia

- Treinamento para dois pesquisadores da República Dominicana sobre doenças e conservação de germoplasma de pimenta-do-reino.

- Apresentação do trabalho no XVIII Congresso Brasileiro de Fitopatologia, em agosto de 1995.

- Visitas a produtores de pimenta-do-reino nos municípios de Capitão Poço (14 a 17/03/95 e 22 a 23/08/95) Castanhal (13/03/95) e Tomé-Açu (26 a 29/09/95).

ELETROFORESE DE ISOENZIMAS

CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DE GERMOPLASMA DE FRUTEIRAS

Carlos da Silva Martins¹
Marli Costa Poltronieri¹
Milton Kanashiro²
Rafael Moysés Alves¹
José Maria Gaia³
Hyroyuri Iketani⁴
Tadashi Kajita⁴

Resumo: A caracterização e avaliação convencional das coleções de germoplasma, geralmente fornecem poucas informações, que além de demoradas estão sujeitas à influência de variações ambientais. A utilização de marcadores moleculares permite maior eficiência na utilização dos recursos genéticos regionais. Este projeto busca a definição de métodos de análises de eletroforese de isoenzimas para culturas de interesse regional, como efetuar a caracterização das coleções destas culturas através de marcadores isoenzimáticos. Foram realizados cinco experimentos com espécies regionais, visando definir protocolos. Os resultados permitiram definir alguns protocolos para análise de eletroforese de isoenzimas em pimenta-do-reino, utilizando-se gel de amido.

¹ Eng. Agr. M.Sc., EMBRAPA - CPATU. Caixa Postal 48, CEP 66.017-970. Belém, PA.

² Eng. Agr., Ph.D., EMBRAPA - CPATU.

³ Bolsista de Pós-graduação da UFPa.

⁴ Consultor da Japan International Cooperation Agency - JICA. Av. Nazaré 272, Sala 105. Ed. Clube de Engenharia, CEP 66.035-170. Belém, PA.

BIOCHEMICAL CHARACTERIZATION OF GERMOPASM IN FRUIT TREE SPECIES

Abstract: The objective of the project is to define methodologies for isozyme electrophoresis analyses for crops with regional interest (black pepper, jaborandi, ipecacuanha, guarana and brazilnut), and to characterize the germoplasm collections of these cultures through markers from isozyme. The conventional characterization and evaluation of germoplasm collections provide little information, besides being slow and subject to the influence of environmental conditions. The utilization of molecular markers provides greater efficiency in the utilization of regional genetic resources. Thus, the objective of this project has been to define methods of isozyme electrophoresis analyses for species of regional interest, characterize the collections in these cultures through markers from isozyme. Five experiments were conducted using regional species, seeking to define protocols. The results have enabled us to define protocols for isozyme electrophoresis analyses in black pepper, utilizing starch gel. The phosphoglucose isomerase (PGI) isozyme was polymorphic for black pepper showing genetic variability among germoplasm collection accessions.

Objetivo

O projeto tem como objetivo definir metodologias de análises de eletroforese de isoenzimas para as principais culturas de interesse regional (pimenta-do-reino, jaborandi, ipeca, cupuaçu, guaraná e castanha-do-brasil), e caracterizar, através de marcadores isoenzimáticos, as coleções de germoplasma dessas culturas.

Justificativa

O uso das técnicas de marcadores moleculares proporciona maior eficiência na conservação, caracterização e uso dos recursos genéticos, além de possibilitar a eliminação de duplicações de acessos e formação de Bancos de Germoplasma mais compactos (maior diversidade, com menor número de acessos). Outro aspecto, é que a identificação imediata de indivíduos por marcadores genéticos poderá servir de grande auxílio na caracterização de genótipos resistentes a doenças e estudos da relação patógeno-hospedeiro, aspecto importante, levando em conta os problemas de doenças na região (ex: pimenta-do-reino, dendê, seringueira, etc.), onde as técnicas convencionais de fitopatologia e melhoramento genético até o momento não têm sido efetivas.

Resultados parciais

Experimento 1 - Eletroforese em gel de amido utilizando pimenta-do-reino, cupuaçu e urucu

Este experimento teve como objetivo verificar as respostas de tecidos (folhas jovens) de pimenta-do-reino, cupuaçu e urucu, em relação à análise de eletroforese de isoenzimas, utilizando gel de amido. Os resultados mostraram que dos cinco sistemas de enzimas utilizados (Menadrona Pedutase - MNR; Enzima Málica - ME; Álcool Desidrogenase - ADH; Glutamato Desidrogenase - GDH e Glutamato Oxaloacetato Transmitase - GOT), somente as enzimas MNR e ME apresentaram bons resultados. Em pimenta-do-reino, ocorreu bandejamento nas dez amostras estudadas, em ambas as enzimas; no urucu somente ocorreu bandejamento para duas amostras (em ME); enquanto que o cupuaçu não apresentou bandas.

Experimento 2 - Análise de eletroforese de isoenzimas utilizando espécies tropicais

O objetivo deste experimento foi verificar a resposta de um grande número de espécies tropicais em relação à análise de eletroforese de isoenzimas , utilizando gel de amido. As espécies utilizadas foram: maracujá, goiaba, mamão, batata-doce, milho, quebra-pedra, boldo, jaborandi, cupuaçu, pimenta-do-reino e urucu; para os seguintes sistemas enzimáticos: MNR, ME, ADH, GDH e GOT. Foram utilizadas folhas jovens de dois indivíduos por espécie. Os resultados mostraram que somente ocorreu bandejamento em MNR (maracujá, batata-doce, milho, indigófera, ipeca, jaborandi, pimenta-do-reino e urucu), ME (milho) e GDH (pimenta-do-reino).

Experimento 3 - Caracterização genética de acessos do Banco de Germoplasma de pimenta-do-reino, utilizando eletroforese de isoenzimas.

O objetivo foi verificar diferenças genéticas entre 26 acessos do Banco de Germoplasma de pimenta-do-reino. As etapas do processo de coleta de material no campo e o preparo das amostras (maceração) no laboratório estão apresentados nas Figs. 67, 68 e 69.



FIG. 67 - Coleta de tecidos vegetais jovens (sementes, caules e folhas) de pimenta-do-reino, EMBRAPA - CPATU, Belém, PA, 1995.



FIG. 68 - Armazenagem de tecidos vegetais de pimenta-do-reino em isopor com gelo, EMBRAPA - CPATU, Belém, PA, 1995.

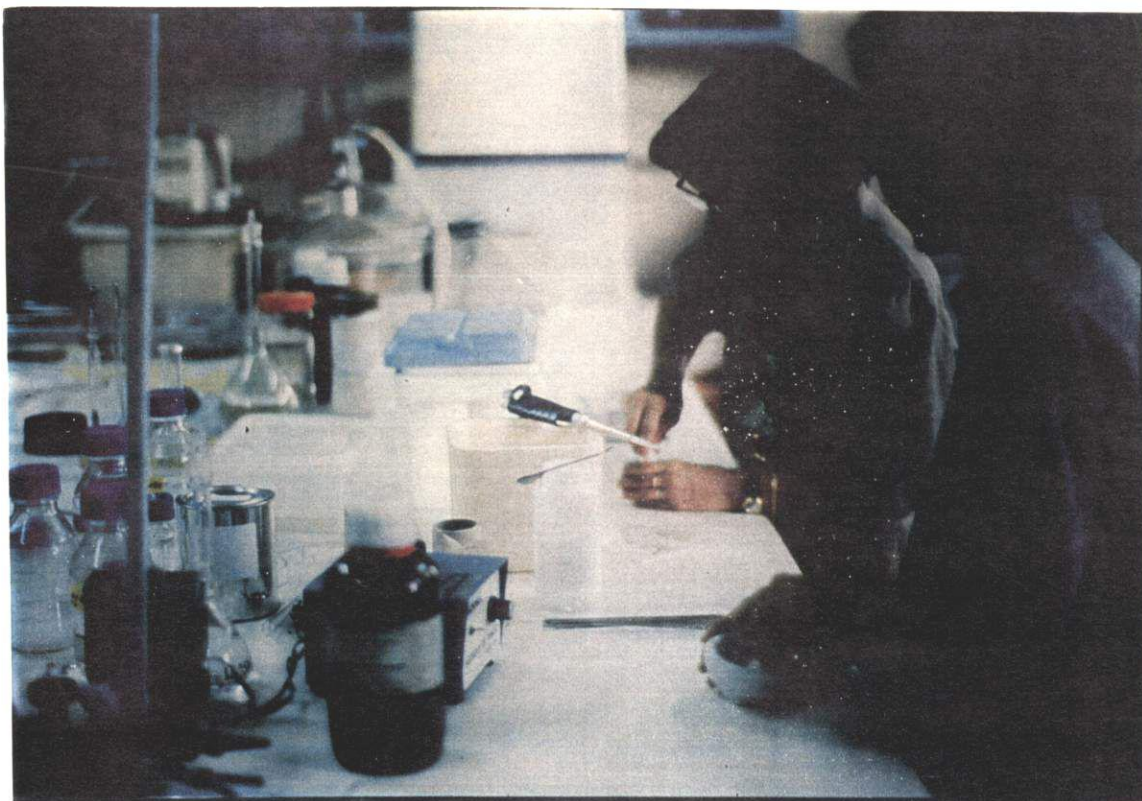


FIG. 69 - Etapa de maceração e centrifugação das amostras coletadas (extração das enzimas), EMBRAPA - CPATU, Belém, PA, 1995.

Foram testados dois tipos de tampões gel-eletrodo e dez sistemas de enzimas: Sistema tampão nº 1 (GDH, MNR, ME, MDH e PGM) e Sistema tampão nº 2 (Malato Desidrogenase - MDH, Fosfoglucomutase - PGM, Fosfogluconato Desidrogenase - 6GP, Isocitrato Desidrogenase - IDH, Isocitrato Desidrogenase - SDH, Gliceraldeído-3-fosfato Desidrogenase - G3P e Fosfoglucoase Isomerasi - PGI).

Apresentaram bandas as seguintes enzimas: MDH, SDH, 6PG, IDH, PGI e ME. Em PGI verificou-se a existência de dois loci: Pgi-1 e Pgi-2 (Fig. 70). O locus Pgi-1 apresentou o mesmo tipo de genótipo (homozigoto) nas 26 amostras (locus monomórfico); o locus Pgi-2 apresentou pelo menos dois genótipos bem visíveis: ab e bb (locus polimórfico). Em ME observou-se um locus monomórfico e homozigoto (Fig. 71). Em IDH verificou-se um locus monomórfico e heterozigoto. Em SDH identificou-se um locus polimórfico, provavelmente com três alelos. Para a enzima 6PG verificou-se um locus, talvez polimórfico e heterozigoto; enquanto que em MDH observou-se três loci, as bandas saíram pouco visíveis, porém pôde-se observar diferenças genéticas entre as amostras.

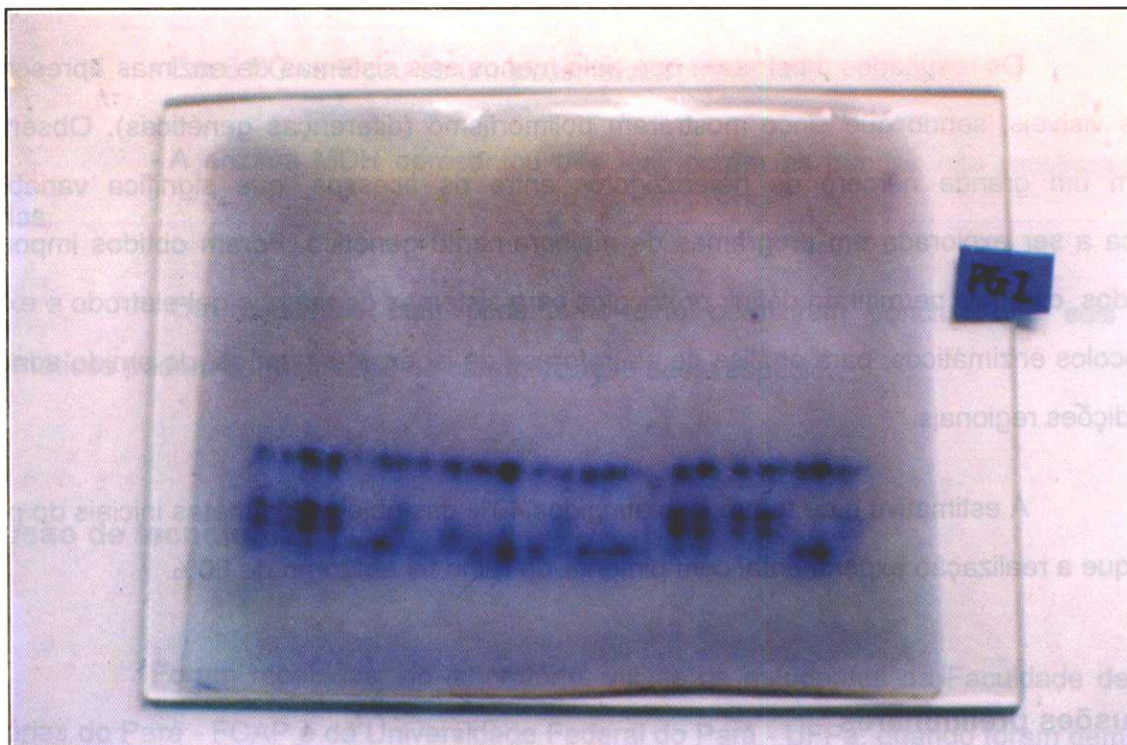


FIG. 70 - Gel da isoenzima Fosfoglucoase Isomerase (PGI), a partir de tecidos de folhas jovens de pimenta-do-reino, EMBRAPA - CPATU, Belém, PA, 1995.

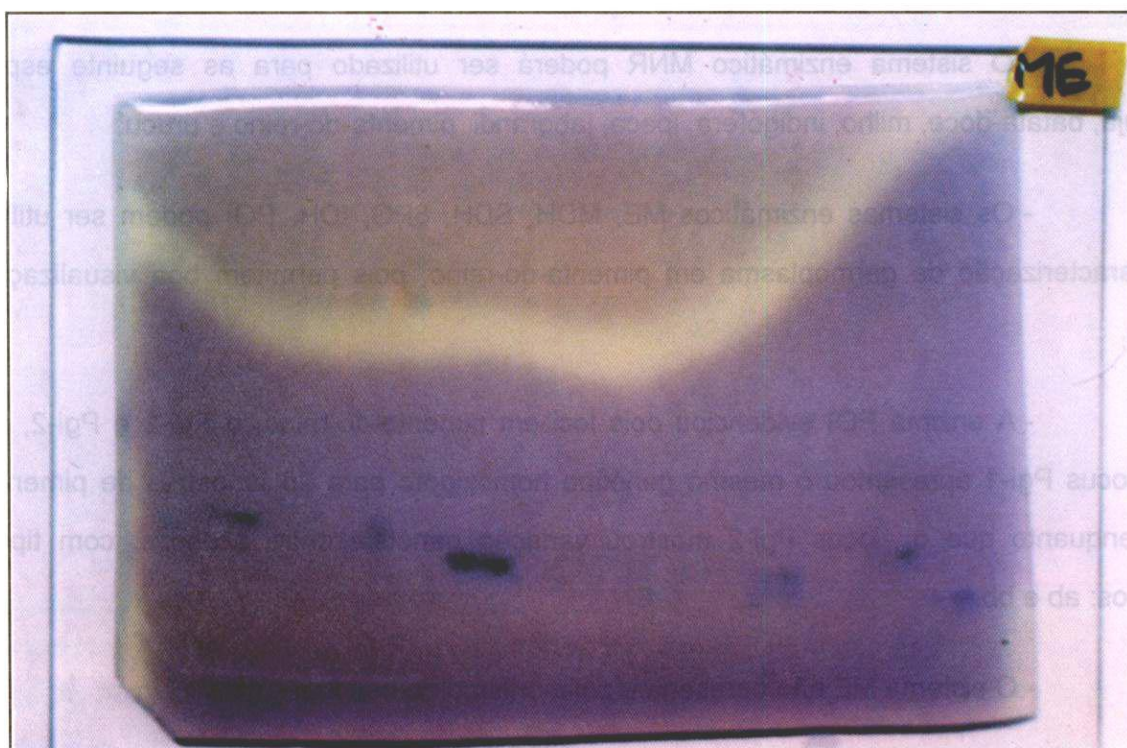


FIG. 71 - Gel da isoenzima Enzima Málica (ME), utilizando-se tecidos de folhas jovens de pimenta-do-reino, EMBRAPA - CPATU, Belém, PA, 1995.

Os resultados mostraram que pelo menos seis sistemas de enzimas apresentaram bandas visíveis, sendo que cinco mostraram polimorfismo (diferenças genéticas). Observou-se também um grande número de heterozigotos entre os acessos, que significa variabilidade genética a ser explorada em programas de melhoramento genético. Foram obtidos importantes resultados, os quais permitiram definir protocolos para sistemas de tampão gel-eletrodo e extração e protocolos enzimáticos, para análise de eletroforese de isoenzimas em gel de amido adaptados às condições regionais.

A estimativa é de terem sido atingidos 40% dos objetivos e metas iniciais do projeto, sendo que a realização experimental com pimenta-do-reino foi em torno de 80%.

Conclusões preliminares

Os resultados, com relação à análise de eletroforese de isoenzimas em gel de amido permitem concluir que:

- O sistema enzimático MNR poderá ser utilizado para as seguintes espécies: maracujá, batata-doce, milho, indigófera, ipeca, jaborandi, pimenta-do-reino e urucu.
- Os sistemas enzimáticos ME, MDH, SDH, 6PG, IDH, PGI podem ser utilizados para caracterização de germoplasma em pimenta-do-reino, pois permitem boa visualização de bandas.
- A enzima PGI evidenciou dois loci em pimenta-do-reino, o Pgi-1 e Pgi-2, sendo que o locus Pgi-1 apresentou o mesmo genótipo homozigoto para 26 amostras de pimenta-do-reino, enquanto que o locus Pgi-2 mostrou variação genética entre acessos, com tipos de genótipos: ab e bb.
- O sistema ME não apresentou polimorfismo de bandas.
- A enzima IDH apresentou um locus monomórfico, heterozigoto.
- A enzima SDH mostrou um locus polimórfico, provavelmente com três alelos.

- Em 6 PG verificou-se um locus, talvez polimórfico, heterozigoto.

- A enzima MDH apresentou três loci, porém as bandas não mostraram-se bem nítidas.

- Os resultados com pimenta-do-reino permitiram concluir que seis sistemas enzimáticos podem ser utilizados na caracterização desta espécie.

Difusão de tecnologia

Foram recebidas, no laboratório, visitas de estudantes da Faculdade de Ciências Agrárias do Pará - FCAP e da Universidade Federal do Pará - UFPa, quando foram demonstrados os métodos de preparo do gel, de eletroforese, de coloração de enzimas e estabelecimento de protocolos para pimenta-do-reino.

CORANTES NATURAIS

ESTUDO PARA IDENTIFICAÇÃO DE VEGETAIS PRODUTORES DE CORANTES, OCORRENTES NA FLORA AMAZÔNICA

Raimunda Fátima Ribeiro de Nazaré¹

Sérgio de Mello Alves²

Wilson Carvalho Barbosa²

Irenice Alves Rodrigues¹

Lênio José G. Faria³

Keiko Kusuhara⁴

Resumo: O projeto propõe, inicialmente, executar a extração, purificação e identificação de corantes naturais de matérias-primas ocorrentes na flora amazônica, e, em seguida, estabelecer técnicas e procedimentos para a produção de corantes naturais em escala piloto (corante de urucu), bem como a realização de testes laboratoriais com a aplicação dos corantes obtidos, com vistas ao emprego em alimentos e em outros produtos de consumo que possam ser utilizados pelo homem. Durante os três anos de atividades, o projeto composto de quatro experimentos (urucu, açaí, cará-roxo e jenipapo), forneceu informações sobre a qualidade de progênies de urucu (*Bixa orellana*), sob o aspecto de produção do corante bixina, para ensaios de melhoramento genético, conduzidos pelo CPATU, nos municípios de Capitão Poço e Tracuateua, Estado do Pará. Realizaram-se extração, concentração e quantificação dos corantes de frutos de açaí (*Euterpe oleracea*) e de tubérculos de cará-roxo (*Dioscorea alata*). De acordo com análise por HPLC, o extrato colorido de açaí possui dois corantes (antocianinas) e o de cará-roxo, apenas um (também antocianina). O quarto experimento, com frutos de jenipapo (*Genipa americana*) foi paralisado, aguardando resultados de análises feitas no Japão, pela consultora da JICA, Dr^a Keiko Kusuhara. Os corantes já isolados (de açaí e de cará-roxo) foram testados para colorir bombons do tipo "bala soft", com excelentes resultados.

¹ Farm. Biol. M.Sc. EMBRAPA-CPATU. Caixa Postal 48, CEP 66.017-970, Belém, PA.

² Quím. Ind. M.Sc. EMBRAPA-CPATU.

³ Quím. Ind. M.Sc. UFPa. Rua Augusto Correa nº 1, CEP 66.075-900, Belém, PA.

⁴ Consultor da Japan International Cooperation Agency - JICA. Av. Nazaré 272, Sala 105. Ed. Clube de Engenharia, CEP 66.035-170, Belém - PA.

STUDY TO IDENTIFY DYE-PRODUCING PLANTS IN AMAZONIAN FLORA

Abstract: Given the prohibition by European countries, the USA and Japan, on the use of synthetic colorings in products for general consumption, in particular foodstuffs, industries in these countries are currently facing a serious problem in finding substitutes for these products. The restriction placed on artificial colorings is based on research results pointing to the possibility that some of these products may potentially cause cancer, and in fact, when tested, this possibility has been confirmed. The objective of this study is to investigate species within the Amazonian flora that contain natural colorings, that may substitute synthetics, and to evaluate the applications of the dye obtained, for food dye and other uses. The project initially proposes to conduct extraction, purification and identification of natural dyes from raw material existing within Amazonian flora. Secondly, it proposes to establish techniques and procedures for the production of natural dyes on a pilot scale (urucu dye), as well as laboratory tests on the application of the dyes obtained, seeking their utilization in foodstuffs and other products consumed and utilized by humans. During three years of activities, this project, with four experiments annatto, açaí, cará-roxo and jenipapo), has provides information on progeny quality of annatto seeds (*Bixa orellana*), about bixin production, from trials of genetic improvement in Capitão Poço and Tracuateua, both in the State of Pará. Extraction, concentration and quantification of açaí fruits (*Euterpe oleracea*) and cará-roxo (*Dioscorea alata*) roots were made. Using HPLC analysis, açaí colored extract showed two colored compounds (antocianins) and cará-roxo extract had only one (antocianin). The fourth experiment, with jenipapo fruits (*Genipa americana*) is, waiting for analysis results from Japão, by JICA's expert Dr^a Keiko Kusuvara. The isolated natural dyes (from açaí and cará-roxo) were used to color candies of hard candies type with gave excellent results.

Objetivo

Investigar na flora amazônica espécies possuidoras de corantes naturais, com possibilidades de se tornarem sucedâneos dos sintéticos, e avaliar a aplicação dos corantes obtidos para colorir produtos alimentícios e outros.

Justificativa

Dada a proibição por parte dos países europeus, EUA e Japão, da aplicação de corantes sintéticos em produtos de consumo geral, especialmente alimentos, as indústrias enfrentam atualmente um sério problema na conquista de substitutos para esses produtos. A restrição feita aos corantes artificiais é baseada em resultados de pesquisas em que foi aventada a possibilidade de alguns apresentarem potencial cancerígeno, enquanto que, vários desses corantes, apresentaram resultados confirmando tal potencialidade.

A United Kingdom publicou o Boletim BS-2450/54, contendo uma advertência de âmbito mundial, quanto às características que os produtos corantes de origem mineral ou sintética apresentam, haja vista possuírem elevado teor tóxico, tratando-se, portanto, de substâncias nocivas à saúde. Ainda sobre o assunto, a Organização Mundial de Saúde (OMS) também manifestou repúdio ao consumo de corantes sintéticos pelas mesmas razões. A repercussão do problema foi mais fortemente sentida no segmento industrial de produtos alimentícios, que nos setores farmacêuticos, cosméticos, tintas, vernizes, etc. Em busca de alternativas, muitas empresas particulares, instituições de pesquisas públicas e privadas vêm investigando as matérias-primas naturais para a substituição dos corantes sintéticos, especialmente em alimentos.

Para a obtenção de corantes naturais da flora amazônica, como alternativa da substituição de corantes sintéticos usados nas indústrias de alimentos, torna-se necessário o conhecimento das espécies sob os pontos de vista botânico, químico, bromatológico, toxicológico, etc., para que o corante obtido não cause danos à saúde do consumidor.

Resultados parciais

Experimento 1 - Urucu (*Bixa orellana*)

Foi determinado o percentual do corante bixina de sementes de urucu, provenientes de áreas de produtores da zona bragantina, Estado do Pará. Determinada pelo processo de extração com clorofórmio, foram obtidos resultados que variaram desde 0,66% (g/100g) até 5,40% (g/100g) de bixina em sementes de dez cultivares, conforme mostrado na Tabela 35.

TABELA 35 - Análise dos teores de umidade e bixina em bases úmida e seca, de dez amostras de cultivares de urucu, cultivados em áreas de produtores instalados na zona bragantina, Estado do Pará.

Cultivar	Umidade (%)	Bixina base úmida (%)	Bixina base seca (%)
Jari 1	8,80	2,46	2,71
Branca	8,76	2,36	2,59
Americana	9,66	0,60	0,66
Uncaria	9,66	0,61	0,68
Pastelão	8,75	4,70	5,15
CPATU	7,21	4,92	5,40
Jari 2	8,88	2,47	2,71
Wagner	8,19	1,52	1,66
Sta. Izabel 1	13,23	3,02	3,48
Sta. Izabel 2	14,25	3,60	4,20

A partir desses estudos foi estabelecida a atuação do projeto referente à matéria-prima urucu, numa primeira fase, como apoio laboratorial às pesquisas de melhoramento genético desenvolvidas no CPATU e, numa segunda fase, o estabelecimento do processo em escala piloto para a produção de corante em pó.

No processo de seleção das cultivares mais produtoras de corantes, foram analisadas 131 amostras de sementes de urucu, das quais, 36 tiveram preferência para a seleção e com estas foram instalados experimentos de ensaios genéticos conduzidos nos municípios paraenses de Tracuateua e Capitão Poço. O material produzido nos dois ensaios foi analisado a cada safra, para a avaliação da quantidade de corantes nas sementes, utilizando o processo KOH (Fig. 72) e Tabelas 36 e 37.

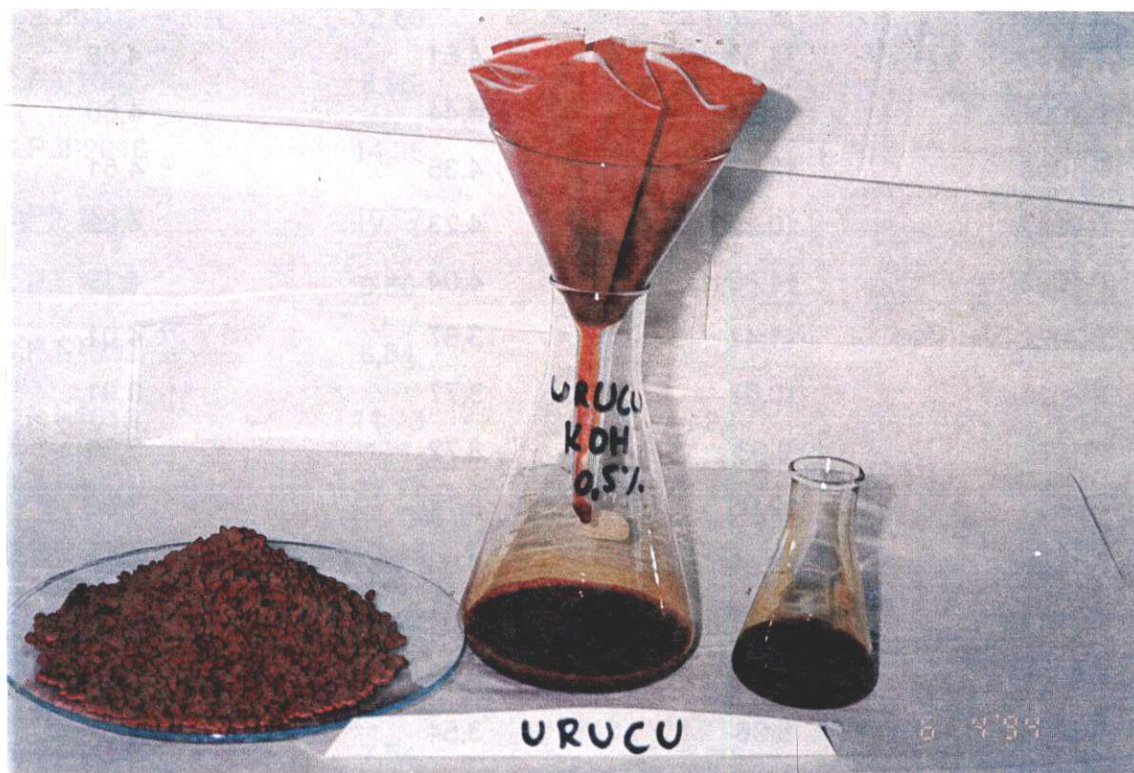


FIG. 72 - Extratos de sementes de urucu pelo processo KOH.

TABELA 36 - Análise dos teores de umidade, norbixina e bixina de sementes de urucu provenientes da primeira coleta de matrizes selecionadas em experimento instalado no município de Tracuateua, PA.

Registro	Umidade (%)	Norbixina base seca (%)	Bixina (%) (Norbixina x 1,037)
T-1011	11,01	6,15	6,38
T-1009	12,72	5,96	6,18
T-2008	10,67	5,37	5,57
T-2027	10,55	5,23	5,42
T-1020	11,24	4,89	5,07
T-1001	14,72	4,72	4,89
T-1021	10,71	4,66	4,83
T-1013	9,98	4,65	4,82
T-2032	11,33	4,51	4,68
T-2001	10,84	4,44	4,60
T-1005	12,07	4,35	4,51
T-2017	10,25	4,23	4,39
T-1002	14,69	4,04	4,19
T-2022	11,47	3,87	4,01
T-2015	10,67	3,77	3,91
T-1032	9,93	3,72	3,86
T-2031	12,96	3,71	3,85
T-1006	13,49	3,63	3,76
T-2014	10,37	3,61	3,74
T-1035	10,31	3,59	3,72
T-1028	8,96	3,54	3,67
T-1003	14,30	3,53	3,66
T-2025	8,83	3,51	3,64
T-2010	11,74	3,50	3,63
T-2018	10,87	3,44	3,57
T-1007	13,33	3,38	3,50
T-1027	9,03	3,36	3,48

TABELA 37 - Análise dos teores de umidade, norbixina e bixina de sementes de urucu provenientes da primeira coleta de matrizes selecionadas em experimento instalado no município de Capitão Poço, PA.

Registro	Umidade (%)	Norbixina base seca (%)	Bixina (%) (Norbixina x 1,037)
C.P.1027	11,06	7,06	7,32
C.P.1013	17,64	6,34	6,57
C.P.2006	15,13	5,93	6,15
C.P.I-1013	16,73	5,80	6,01
C.P.1021	10,88	5,33	5,53
C.P.2012	15,58	5,19	5,38
C.P.2010	12,55	4,82	5,00
C.P.I-1002	8,95	4,17	4,32
C.P.II-2016	14,25	4,10	4,25
C.P.I-1018	10,77	4,09	4,24
C.P.I-1020	9,60	3,95	4,10
C.P.I-1032	8,64	3,94	4,08
C.P.I-1015	11,73	3,92	4,06
C.P.I-1031	11,12	3,69	3,83
C.P.II-2025	13,40	3,69	3,83
C.P.II-2029	15,13	3,65	3,78
C.P.II-2001	10,83	3,64	3,77
C.P.I-1006	7,54	3,60	3,73
C.P.II-2008	14,15	3,56	3,69

A coleta da segunda safra de urucu, nos experimentos em ambos os municípios, foi realizada com certa dificuldade que se estendeu à execução das etapas posteriores à colheita, uma vez que não se dispunha de pessoal necessário à rápida realização do beneficiamento pós-colheita e ao preparo das amostras para análise. O tempo demasiado longo, as altas temperaturas e o excesso de raios solares sofridos pelo material, desde a coleta até o momento das análises, causaram sérios danos ao mesmo, sendo este fato ratificado pelos baixos teores de norbixina e bixina encontrados. Os dados compõem as Tabelas 38 e 39.

TABELA 38 - Análise dos teores de umidade, norbixina e bixina de sementes de urucu provenientes da segunda coleta de matrizes selecionadas em experimento instalado no município de Capitão-Poço, PA.

Registro	Umidade (%)	Norbixina base seca (%)	Bixina (%)
Capitão-Poço - 1001	8,89	4,26	4,42
Capitão-Poço - 1009	9,78	4,18	4,33
Capitão-Poço - 1005	10,11	4,16	4,31
Capitão-Poço - 1013	9,30	4,16	4,31
Capitão-Poço - 1007	10,13	3,84	3,98
Capitão-Poço - 1014	9,10	3,60	3,73
Capitão-Poço - 1032	8,68	3,56	3,69
Capitão-Poço - 1031	9,26	3,47	3,60
Capitão-Poço - 1017	8,85	3,45	3,58
Capitão-Poço - 1008	9,39	3,39	3,51
Capitão-Poço - 1020	9,81	3,30	3,42
Capitão-Poço - 1015	8,28	3,22	3,34
Capitão-Poço - 1027	8,16	3,18	3,30
Capitão-Poço - 1016	9,27	3,13	3,24
Capitão-Poço - 1029	9,11	2,95	3,06
Capitão-Poço - 1019	8,65	2,94	3,05
Capitão-Poço - 1010	10,66	2,88	2,99
Capitão-Poço - 1030	8,36	2,78	2,88
Capitão-Poço - 1033	9,76	2,78	2,88
Capitão-Poço - 1011	8,27	2,64	2,74
Capitão-Poço - 1004	9,34	2,62	2,72
Capitão-Poço - 1035	9,65	2,59	2,68
Capitão-Poço - 1018	8,95	2,56	2,65
Capitão-Poço - 1034	9,00	2,55	2,64
Capitão-Poço - 1025	9,34	2,54	2,63
Capitão-Poço - 1012	8,77	2,47	2,56
Capitão-Poço - 1023	8,44	2,42	2,51
Capitão-Poço - 1028	9,43	2,12	2,20
Capitão-Poço - 1022	10,40	1,95	2,02
Capitão-Poço - 1024	9,23	1,90	1,97
Capitão-Poço - 1036	8,96	1,82	1,89
Capitão-Poço - 1026	9,11	1,75	1,81

TABELA 39 - Análise dos teores de umidade, norbixina e bixina de sementes de urucu provenientes da segunda coleta de matrizes selecionadas em experimento instalado no município de Tracuateua, PA.

Registro	Umidade (%)	Norbixina base seca (%)	Bixina (%)
Tracuateua - 1001	10,46	4,51	4,68
Tracuateua - 1031	9,75	3,92	4,06
Tracuateua - 1013	8,09	3,79	3,93
Tracuateua - 1032	10,66	3,77	3,91
Tracuateua - 1027	5,82	3,58	3,71
Tracuateua - 1005	8,78	3,53	3,66
Tracuateua - 1021	6,70	3,42	3,55
Tracuateua - 1007	7,14	3,41	3,54
Tracuateua - 1008	7,64	3,37	3,49
Tracuateua - 1020	6,15	3,28	3,40
Tracuateua - 1016	8,48	3,10	3,22
Tracuateua - 1015	7,94	3,07	3,19
Tracuateua - 1002	9,87	2,96	3,07
Tracuateua - 1033	7,93	2,96	3,07
Tracuateua - 1006	6,28	2,91	3,02
Tracuateua - 1012	6,91	2,87	2,97
Tracuateua - 1014	6,64	2,87	2,98
Tracuateua - 1028	7,14	2,87	2,92
Tracuateua - 1035	7,14	2,86	2,97
Tracuateua - 1017	8,05	2,84	2,94
Tracuateua - 1030	8,72	2,83	2,93
Tracuateua - 1004	10,43	2,82	2,92
Tracuateua - 1010	9,79	2,70	2,80
Tracuateua - 1029	7,29	2,66	2,73
Tracuateua - 1024	7,64	2,60	2,70
Tracuateua - 1025	6,91	2,59	2,68
Tracuateua - 1018	9,36	2,48	2,57
Tracuateua - 1026	7,87	2,45	2,56
Tracuateua - 1034	7,54	2,45	2,54
Tracuateua - 1003	10,85	2,43	2,52
Tracuateua - 1036	8,67	2,31	2,39
Tracuateua - 1019	7,11	2,21	2,29

O material da primeira coleta de Capitão-Poço apresentou maior percentual de corante, 7,32% de bixina, enquanto que o da segunda apresentou teor máximo de 4,42%. Nas amostras provenientes de Tracuateua ocorreu da mesma forma, na primeira coleta foi encontrado teor máximo de 6,38% de bixina, enquanto que na segunda o maior conteúdo de bixina foi 4,68%. O trabalho será continuado, esperando-se que este tipo de interferência não mais ocorra, causando prejuízos na interpretação dos resultados obtidos neste experimento.

É necessária a prorrogação do prazo de execução do projeto para o alcance pleno dos objetivos, que visam acompanhar o comportamento das cultivares em cada safra. Conclui-se que mais dois anos de atividades, a contar de junho de 1995 a maio de 1997, serão suficientes para a conclusão do experimento, o que será conseguido pelo estabelecimento do processo piloto de produção do corante de urucu em pó.

Com a consultoria da JICA foram iniciados testes de extração de corantes de açafrão, repolho-roxo, milho-roxo e beterraba, funcionando como base metodológica do processo e de comparação com os extratos de açaí e cará-roxo. Os dados obtidos nos testes com o açafrão são apresentados na Tabela 40.

TABELA 40 - Extração do corante de açafrão com álcool etílico P.A., a 50% e com ácido clorídrico a 1%, seus correspondentes valores em CV e CQ nos extratos e CQ nas amostras.

Solvente	Diluição	Absorbância 425nm	CV Extrato	CQ Extrato	CQ Amostra/g
ET-OH/50%	0,5ml extr/25ml	0,640	32,00	6.400	320
ET-OH/PA	0,2ml extr/25ml	0,830	103,75	20.750	1.037
HCl/1%	Sem diluição	0,14	0,14	28	1,4

CV = Valor de cor; e CQ = Quantidade de cor.

Experimento 2 - Açaí (*Euterpe oleracea*)

Os resultados dos testes de extração do corante de frutos de açaí, com diferentes solventes (Fig. 73), forneceram os resultados apresentados na Tabela 41.

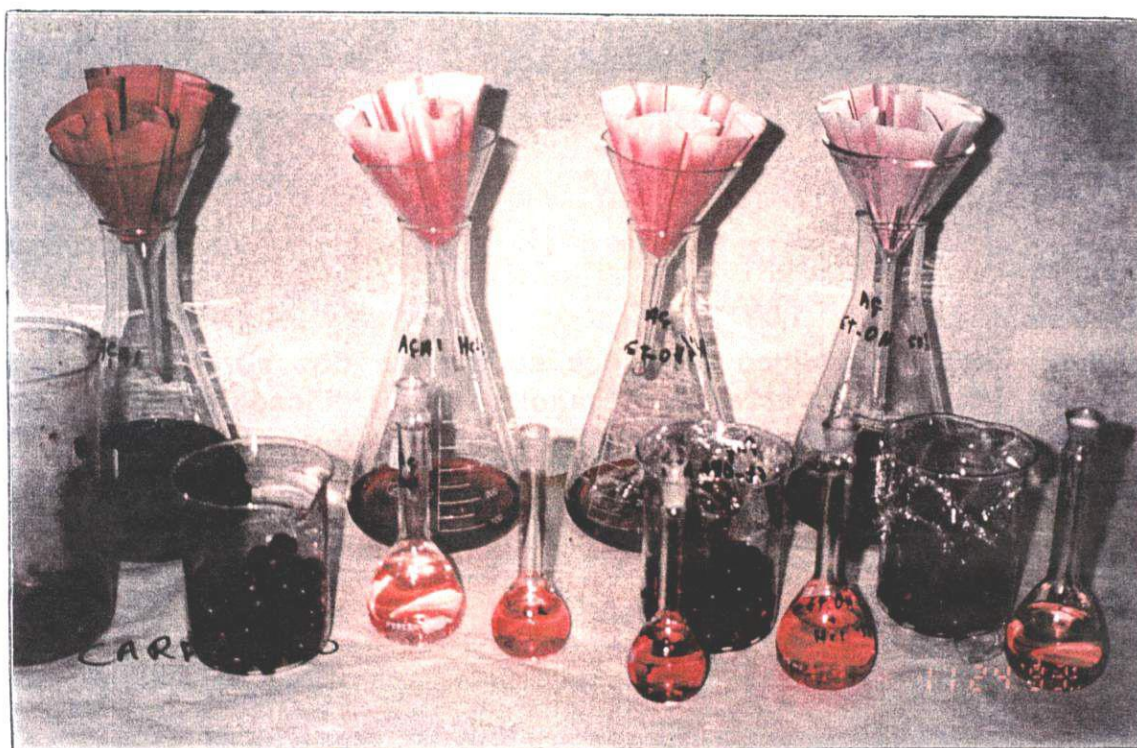


FIG. 73 - Extratos dos corantes de frutos de açaí, com diferentes solventes.

TABELA 41 - Resultados de absorbância máxima, CQ e CV de amostras de açaí tratadas com diferentes solventes.

Solvente	Solvente/ Amostra	Absorbância Máxima/ λ max	CQ/100ml	CV/gA
Etanol 50%	100ml/100g	0,160/536nm	160	1,60
HCl 1%	100ml/100g	0,465/515nm	11.625	11,62
Etanol 50% + HCl 1%	100ml/100g	0,435/525nm	1.087,5	10,87

CQ = Quantidade de cor; CV = Valor de cor.

A princípio, o maior valor d₅₀₂ de cor (CV=11,6) foi obtido utilizando-se solução de HCl a 1%. O extrato de açaí tem coloração púrpura, em pH ácido, e verde-escura azulada, em pH alcalino. Trata-se de um corante da classe das antocianinas.

Está sendo observado, após vários testes com diferentes solventes, o melhor processo extrativo desse corante, para tanto é usando um extrator composto de água, álcool etílico a 10% e ácido clorídrico a 0,1%, em maceração a frio. Estão sendo obtidos extratos coloridos da primeira extração, com CV variando entre 84,4 e 89,4 (Tabelas 42 e 43), enquanto nos testes anteriores (novembro de 1993) o extrato de açaí que apresentou o mais elevado CV foi 11,62.

TABELA 42 - Teste com cinco extrações sucessivas dos corantes de açaí (1), (*Euterpe oleracea*), com Etanol a 10%, acidificado com 0,1% de HCl e as respectivas observações de cada extrato.

Observações	Amostra 1 (Etanol 10% + 0,1% de HCl)				
	1ª Extração	2ª Extração	3ª Extração	4ª Extração	5ª Extração
Volume amostra (ml)	50	64	45	44	45
Diluição amostra (ml/ml)	0,5/100	1,5/100	1,5/100	1,0/100	1,0/100
Comprimento de onda máximo (nm)	514,5	513,0	514,0	513,5	513,5
Absorbância máxima	0,447	0,811	0,717	0,570	0,702
CV *	89,4	54,1	47,8	57,0	70,2
CV */ml	4470	3462	2151	2508	3159

CV * = Valor de cor

TABELA 43 - Teste com cinco extrações sucessivas dos corantes de açaí (2), (*Euterpe olleracea*), com Etanol a 20%, acidificado com 0,1% de HCl e as respectivas observações de cada extrato.

Observações	Amostra 2 (Etanol 20% + 0,1% de HCl)				
	1ª Extração	2ª Extração	3ª Extração	4ª Extração	5ª Extração
Volume amostra (ml)	50	65	45	50	48
Diluição amostra (ml/ml)	0,5/100	1,5/100	1,5/100	2,0/100	1,0/100
Comprimento onda máximo (nm)	515,0	514,5	514,0	514,0	514,5
Absorbância máxima	0,422	0,560	0,745	0,879	0,656
CV *	84,4	37,3	49,7	44,0	65,6
CV */ml	4220	2425	2237	2200	3149

CV * = Valor de cor.

Foram verificadas algumas interferências no processo extrativo dos corantes, sendo o mais marcante o tempo de extração. A princípio deve-se fixar o intervalo de tempo considerado entre uma extração e outra, para minimizar este tipo de interferência. Tanto no teste com Etanol a 10% como no a 20%, na quinta extração foram obtidos CV's bem acima dos verificados na quarta extração, e isto ocorreu em função do intervalo de tempo que foi relativo a um final de semana. Pretende-se estabelecer o tempo de extração e o número de extrações economicamente viáveis para recomendação neste processo com o açaí.

O extrato de açaí submetido a TLC, apresentou duas substâncias da classe de antocianinas, como responsáveis pela coloração da amostra em estudo. Foram feitos testes de utilização do corante de açaí no preparo de bombons (tipo "hard candies"), com bons resultados.

Os testes de extração dos corantes de açaí, bem como os de utilização dos mesmos, indicam tratar-se de uma matéria-prima muito promissora como fonte de corante natural.

Experimento 3 - Cará-roxo (*Dioscorea alata*)

Os tubérculos dessa espécie, "in-natura", foram submetidos à extração para obtenção do corante de cará-roxo (Fig. 74).



FIG. 74 - Extratos do corante de cará-roxo, com diferentes solventes.

Amostras de cará-roxo submetidas à extração com HCl 1%, forneceram extratos de coloração semelhante à do açaí e o CV/gA extraído foi o mais elevado (19,0). Estes dados podem ser observados na Tabela 44.

TABELA 44 - Resultados de absorvância máxima, valor de cor (CV) e quantidade de cor (CQ) de amostras de cará-roxo, tratadas com diferentes solventes.

Solvente	Extração Solvente/Amostra	Diluição (ml/ml)	Absorvância máxima	CV	CQ/100ml	CV/gA
Etanol puro	200ml/50g	5/25	0,315/510nm	1,57	315	6,3
Etanol 50% + NaOH 1%	200ml/50g	S/d	0,440/510nm	0,44	88	1,7
HCl 1%	200ml/50g	1/25	0,190/510nm	4,75	950	19,0
NaOH 1%	200ml/50g	S/d	0,540/510nm	0,54	108	2,16

CV = Valor de cor do extrato de amostra; CV/gA = Valor de cor da matéria-prima; CQ/100ml = Quantidade de cor em 100ml de extrato de amostra

O corante de cará-roxo foi extraído com Etanol a 10% e a 20%, acidificados com 0,1% de HCl. As observações feitas para cada extrato são apresentadas na Tabela 45.

TABELA 45 - Extração do corante de duas amostras de cará-roxo (*Dioscorea alata*) com Etanol a 10% (1) e a 20% da amostra (2), acidulados com 0,1% de HCl, e as observações de CV; CV/vol e CV/gA, feitas para cada extrato.

Observações	Amostra (1)	Amostra (2)
Amostra (g)	196,2	196,0
Etanol (%)	10	20
Volume extrato (ml)	40	50
CV *	40,9	37,5
CV */Vol. extrato	1,636	1,875
CV */g. amostra	8,34	9,57

CV * = Valor de cor.

Dando seqüência aos estudos com o cará-roxo, foram adquiridos em feira-livre da cidade de Belém alguns tubérculos para extração do corante em laboratório. Foi observado que a amostra apresentou a coloração púrpura muito forte em comparação com outras já trabalhadas. Através de leitura do extrato em espectrofotômetro, obteve-se o CV = 46,6 , enquanto que as amostras obtidas em experimento agrônômico na área do CPATU, apresentaram CV = 13,8. Os resultados deste teste são apresentados na Tabela 46.

TABELA 46 - Extração do corante de duas amostras de cará-roxo (*Dioscorea alata*), com solução de HCl 1% e as observações de CV; CV/vol e CV/gA, feitas para cada extrato.

Observações	Amostra (1)	Amostra (2)
Amostra (g)	200	200
Volume extrato (ml)	39	48
Comprimento onda máximo (nm)	525	525
Absorbância máxima	0,466	0,138
CV *	46,6	13,8
CQ **/vol. extrato	1.817,4	662,4
CQ **/g. amostra	9,087	3,312

CV * = Valor de cor; e CQ ** = Quantidade de cor

Os resultados dos quatro testes de extração do corante de cará-roxo, mostraram variação da intensidade de cor desse corante em função da matéria-prima. Há diferença perceptível a olho nu, quanto à intensidade de "roxo", entre um e o outro material "in-natura".

Através de cromatografia em placa de camada fina (TLC) pode-se confirmar, após o uso dos padrões de milho-roxo e repolho-roxo, que o açaí e o cará-roxo possuem corantes da classe de antocianinas: o açaí tem dois corantes (Rf 0,34 e 0,57); o cará-roxo apenas um (Rf 0,47); o milho-roxo tem dois (Rf 0,28 e 0,58) e o repolho-roxo também tem dois (Rf 0,53 e 0,66). Estes dados foram obtidos usando placa de celulose Funasel SF e solvente n-butanol: ácido acético: água = 4:1:2.

Experimento 4 - Jenipapo (*Genipa americana*)

Os frutos maduros submetidos à extração com diferentes solventes forneceram um extrato amarelo cristalino (Fig. 75), enquanto que os frutos verdes, extraídos com solução de hidróxido de sódio a 0,1%, fornecem extrato azul-anil (Fig. 76).



FIG. 75 - Extratos de frutos maduros de jenipapo, utilizando diferentes solventes.



FIG. 76 - Extratos de frutos verdes de jenipapo, utilizando solução de NaOH a 0,1%.

Os resultados de ensaios preliminares com o jenipapo indicaram a presença de um corante semelhante à genipina, corante natural usado em alimentos e muito popular no Japão. Reiniciadas as atividades com essa matéria-prima, verificou-se que o extrato etanólico de cor azul-índigo, assume a coloração verde-azulada durante o processo de concentração em evaporador rotativo, à temperatura entre 40°C e 45°C sob vácuo. Em decorrência deste fato, a pesquisa deverá tomar novos rumos, uma vez que embora o pigmento seja um geniposídeo, não apresenta reação semelhante à genipina.

Conclusões preliminares

O experimento com o urucu está sendo muito bem conduzido e as técnicas de análise do conteúdo de corantes nas sementes dessa matéria-prima já constitui rotina analítica perfeitamente dominada, restando apenas a definição do processo de produção do corante de urucu em pó, numa escala piloto, para a conclusão dos trabalhos com esta espécie.

Os experimentos com o açaí e com o cará-roxo estão em andamento. Foram detectados por HPLC a existência de dois corantes no açaí e um corante no cará-roxo, todos da classe de antocianinas. Estão sendo feitos testes de utilização dos corantes em produtos alimentícios e serão iniciados também estudos de estabilidade dos corantes à ação de pH, luz, agentes oxidantes e temperatura.

Difusão de tecnologia

Os resultados alcançados foram divulgados através de:

- Apresentação de dois trabalhos técnicos no "Simpósio Internacional de Urucu e Corantes Naturais", Campinas, SP, em junho de 1991.
- Apresentação de trabalho no Work Shop CPATU/JICA, realizado no CPATU, Belém, PA, em abril de 1994.
- Apresentação de duas palestras no "II Congresso Brasileiro de Corantes Naturais e II Simpósio Brasileiro de Urucu". Belém, PA, em setembro de 1994.
- Apresentação de quatro trabalhos técnicos no "II Congresso Brasileiro de Corantes Naturais e II Simpósio Brasileiro de Urucu". Belém, PA, em setembro de 1994.
- Veiculação de matéria jornalística através da imprensa local (Diário do Pará, O Liberal, etc).

PROPAGAÇÃO DE PLANTAS VIA CULTURA DE TECIDOS

MELHORAMENTO DE PLANTAS DE INTERESSE ECONÔMICO PARA A REGIÃO AMAZÔNICA ATRAVÉS DE TÉCNICAS "IN VITRO"

Oriel Filgueira de Lemos¹
Osmar Alves Lameira¹
Ilmarina Campos de Menezes²
Milton Guilherme da C. Mota³
Seibi Oka⁴
Takeo Saito⁴
Masatoshi Sato⁴

Resumo: No projeto "Melhoramento de plantas de interesse econômico para a região amazônica", através de técnicas "in vitro", estão sendo desenvolvidos métodos de propagação clonal, obtenção de variação somaclonal e suspensão de células de espécies vegetais inseticidas, medicinais, condimentares e frutíferas. Foram estudados procedimentos de assepsia de material vegetal proveniente de campo, meios básicos de cultivo, e concentrações e combinações de fitorreguladores para obtenção de protocolos. Dentre os trabalhos desenvolvidos estão a propagação clonal através de ápice caulinares e segmentos nodais, obtenção de calo, formação de embriões somáticos e teste de germinação "in vitro". Na micropropagação do bacuri (*Platonia insignis*) e castanha-do-brasil (*Bertolletia excelsa*) os resultados não são conclusivos. Algumas espécies como pimenta-do-reino (*Piper nigrum*) e ipeca (*Cephaelis ipecacuanha*) são facilmente propagadas utilizando-se segmentos nodais e ápices caulinares. Uma das dificuldades encontradas foi o estabelecimento de um método eficiente de assepsia do material proveniente do campo.

¹ Eng. Agr. M.Sc., EMBRAPA - CPATU. Caixa Postal 48, CEP 66.017-970. Belém, PA.

² Eng. Agr., EMBRAPA - CPATU.

³ Eng. Agr., Ph.D., EMBRAPA - CPATU.

⁴ Consultor da Japan International Cooperation Agency - JICA. Av. Nazaré 272, Sala 105. Ed. Clube de Engenharia, CEP 66.035-170. Belém, PA.

IMPROVEMENT OF ECONOMICALLY IMPORTANT PLANTS TO THE AMAZON REGION THROUGH "IN VITRO" TECHNIQUES

Abstract: The objective of this project is to develop tissue culture techniques to provide decisive aid to the programs of Genetic Improvement and Germoplasm Conservation, as well as to discover efficient micropropagation systems for fruit, medicinal and condiment-producing species. In the project: Improvement of plants economically important to the Amazon region through "In vitro" techniques are being developed for clonal propagation, on obtention of somal variation and cell suspension of different plants: insecticides, medicinal, condiments and fruit species. For such, methods have been studied as to assepsia of plant material coming from the field, basic cultivation methods, concentrations and combinations of phytohormones to obtain protocols. Within the work developed, there are studies on clonal propagation through stem tips and nodal segments, "callus" obtention, somatic embryo formation and "in vitro" germination tests. Results have not been conclusive for micropropagation of bacuri (*Platonia insignis*) and Brazilnut (*Bertholletia excelsia*). Some species, such as black pepper (*Piper nigrum*) and ipeca (*Cephaelis ipecacuanha*) are easily propagated using nodal segments and stem tips. One of the difficulties encountered has been to establish an efficient method for providing assepsia of material brought in from the field.

Objetivo

Este projeto tem como objetivo desenvolver técnicas de cultura de tecidos que auxiliem, de maneira decisiva, os programas de melhoramento genético e de conservação de germoplasma, assim como sistemas eficientes de micropropagação de espécies frutíferas, medicinais e condimentares.

Justificativa

Algumas espécies medicinais, inseticidas e frutíferas, que ocorrem na Amazônia, apresentam grande potencial para exploração econômica. Entretanto, não se dispõe de informações sobre a reprodução, a propagação e, principalmente, sobre o sistema de cultivo racional, pois a exploração é feita basicamente através de extrativismo. Esses aspectos, aliados à expansão da fronteira agrícola e à

forte demanda por seus produtos, têm provocado devastação de áreas de ocorrência natural dessas espécies, com ameaça de erosão genética e extinção de parte da biodiversidade existente.

Nesse aspecto há necessidade de uma ação rápida no sentido de desenvolver técnicas de domesticação, sistema de cultivo, preservação de germoplasma e trabalho de melhoramento genético que possam colocar à disposição do setor produtivo, material de grande potencial para cultivo. As técnicas desenvolvidas dentro da biotecnologia, que envolve propagação através de segmento de tecido, suspensão de células e obtenção de híbridos somáticos, surgem como alternativas promissoras, tanto para propagação em larga escala de plantas saudáveis, quanto para auxiliar em programas de melhoramento genético. O desenvolvimento de sistema de regeneração de plantas eficiente dependerá, dentre outras coisas, de método eficiente de assepsia, diferenciação e aclimação de plantas.

Resultados parciais

Considerando-se a biotecnologia de plantas uma alternativa promissora, tanto para micropropagação de plantas quanto para auxiliar programas de melhoramento genético vegetal, foram executadas atividades de pesquisa visando desenvolver protocolos para micropropagação, exploração da variação somaclonal e obtenção de suspensão de células, envolvendo as seguintes espécies: timbó (*Derris urucu*), quina (*Quassia amara*), ipeca (*Cephaelis ipecacuanha*), pimenta-do-reino (*Piper nigrum*), castanha-do-brasil (*Bertholletia excelsa*), bacuri (*Platonia insignis*), urucu (*Bixa orellana*), guaraná (*Paullinia cupana*) e açaí (*Euterpe oleracea*).

- Timbó

O timbó é uma planta amazônica usada, principalmente, pelas populações ribeirinhas, na captura de peixes. Este uso deve-se, particularmente, pela rotenona contida nas raízes de plantas do gênero *Derris*. Mais recentemente, o timbó vem sendo usado para o controle de pragas de lavoura, o que constitui uma alternativa de uso como inseticida, por ser potencialmente tão eficaz quanto outros produtos sintéticos. Objetivando a substituição do extrativismo desta espécie, estão sendo conduzidos estudos para a domesticação do timbó.

Neste contexto estão sendo desenvolvidos testes de micropropagação para obtenção rápida de material clonado, para posterior estudos fisiológicos e agrônômicos. Para propagação do timbó em laboratório, o problema crucial é o elevado índice de contaminação de explantes em cultura, provenientes de plantas crescidas diretamente no campo.

Nos experimentos utilizaram-se folhas novas e segmentos jovens de caule, como explantes, provenientes de plantas do Banco de Germoplasma do CPATU. Para assepsia dos explantes foram realizados vários testes utilizando-se detergente e lavagens em água corrente, choque térmico em temperaturas de 50°C e 5°C, imersão em solução de hipoclorito de sódio (NaClO) a várias concentrações e tempo, imersão em solução de sulfato de estreptomicina (10 mg/100 ml H₂O) e tratamento das plantas em campo, antes da retirada dos explantes, com solução de benlate a 200 ppm.

As respostas observadas quando do uso de choque térmico e imersão dos explantes em solução de hipoclorito de sódio a 1,0; 2,0; 3,0 e 3,5% de cloro ativo, durante 10, 15, 20 e 30 minutos, respectivamente, foram de contaminação total. Porém, quando as plantas do campo foram tratadas, antes da retirada dos explantes, com solução de benlate, e esses explantes lavados previamente em água destilada com detergente em aparelho ultrasonic, em seguida tratados com solução de hipoclorito de sódio, a diferentes tempos de duração, e imersos em solução de sulfato de estreptomicina e ácido ascórbico, apresentaram respostas conforme mostra a Tabela 47.

TABELA 47 - Efeito da ação de hipoclorito de sódio (NaClO a 1%) a diferentes tempos de imersão, para assepsia de explantes de timbó após quinze dias de cultura.

Tempo imersão (min.)	Explante não-contaminado (%)
10	3,03
20	15,15
30	54,54

Esses resultados indicaram que existem grandes dificuldades em obter explantes assépticos para iniciar as etapas subseqüentes de estabelecimento de protocolo para

micropropagação. Ressalta-se que quanto maior a concentração ou o tempo de imersão dos explantes, em solução de hipoclorito de sódio, maiores são os danos observados nos tecidos e, conseqüentemente, as respostas desses à ação de meios de cultura com reguladores de crescimento têm sido prejudicadas. Observou-se raro êxito para emissão de brotos. Portanto, é necessária, para superar essa primeira etapa (asepsia de explantes), a condução de plantas matrizes em casa-de-vegetação sob condições controladas e com tratamentos fitossanitários.

- Quina

A espécie quina é uma planta arbustiva comum na América Tropical que tem como princípio ativo a quassina, alcalóide de ação inseticida e biodegradável. Estão sendo realizados estudos visando à sua domesticação e estabelecimento de sistema de cultivo. Uma das etapas dos estudos com esta espécie é a de estabelecer o protocolo de micropropagação para obtenção rápida de mudas.

Para asepsia dos explantes, obtidos de mudas e de plantas crescidas diretamente no campo, estes foram lavados em água por várias vezes e imersos em álcool 70%, por cinco segundos, seguido de tratamento com hipoclorito de sódio a várias concentrações e tempo de imersão, com posterior lavagem em água destilada autoclavada e inoculação em meio de cultura sob câmara de fluxo laminar.

As Tabelas 48 e 49 mostram os resultados de dois experimentos para asepsia de explantes, porém no segundo experimento (Tabela 49), antes da imersão em hipoclorito de sódio, os explantes foram lavados com água destilada autoclavada e detergente em aparelho ultrasonic.

TABELA 48 - Efeito da ação de hipoclorito de sódio (NaClO a 1%) a diferentes tempos de imersão, para asepsia de explantes de quina após dez dias de cultura.

Tempo imersão (min.)	Explante não-contaminado (%)
10	35,0
20	68,0
30	75,0

TABELA 49 - Efeito da ação de hipoclorito de sódio (NaClO a 1%) a diferentes tempos de imersão, para assepsia de explantes de quina após quinze dias de culturas.

Tempo imersão (min.)	Explante não-contaminado (%)
20	66,67
30	86,67

Nesses experimentos observou-se que quanto maior o tempo de imersão dos explantes, em solução de hipoclorito de sódio, maior a eficiência de assepsia, porém, maiores são os danos nos tecidos. Por conseguinte, a obtenção de plantas matrizes sob casa-de-vegetação, com tratamentos fitossanitários, certamente minimizará esse problema e tornará mais eficiente o processo de assepsia.

Os explantes não-contaminados foram transferidos para meio B5 (Gamborg et al., 1968), suplementado com BAP 2,5 mg/l, no qual alguns explantes emitiram brotações. Outrossim, quando foram transferidos para meio MS (Murashige & Skoog, 1962), suplementado com várias combinações de 6-benzilaminopurina (BAP 1,0; 5,0 e 10,0 mg/l) e ácido naftalenoacético (ANA 0,1; 0,5 e 1,0 mg/l) induziram calos (Fig. 77). Entretanto, ao submeter os calos ao mesmo meio, mas apenas com BAP (1,0; 5,0 e 10,0 mg/l) não favoreceram diferenciação, assim como, após cerca de 45 dias, após serem transferidos para novo meio, metade da concentração de sais básico MS (1/2 MS) suplementado com zeatina (0,0; 0,05; 0,1 e 0,5 mg/l), também não permitiram diferenciação dos calos em plântulas via embriogênese ou organogênese.

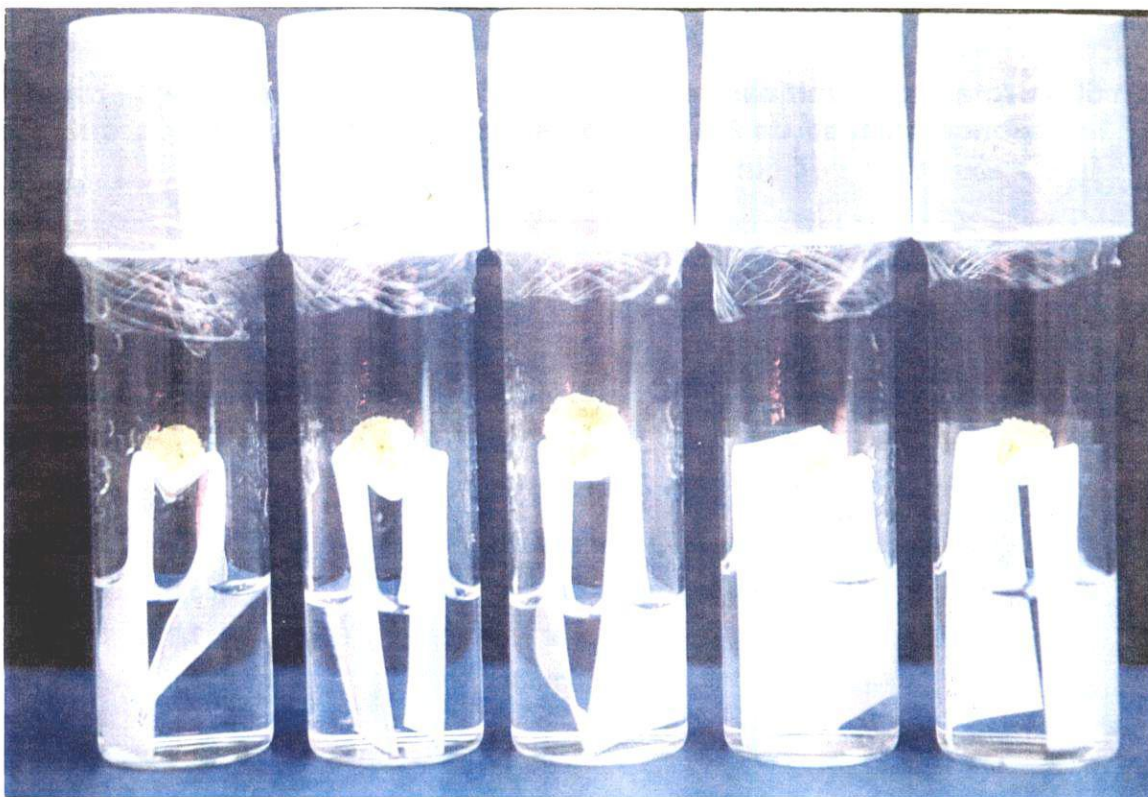


FIG. 77 - Indução de calos a partir de segmentos de caule de quina.

- Ipeca

A ipeca é uma planta herbácea nativa de regiões úmidas. A principal característica é a formação, nas raízes, de dois alcalóides (cefalina e emetina) usados em medicamentos. Devido ao desmatamento e à coleta indiscriminada, a área de ocorrência da espécie vem se reduzindo gradativamente. São necessários, dentre outros, estudos de propagação rápida para viabilizar o sistema de produção racional. No trabalho de micropropagação de ipeca foram usados segmentos nodais e internodais de caule. A Tabela 50 mostra as médias de brotações induzidas em diferentes meios de cultura.

TABELA 50 - Brotações emitidas em meio B5 suplementado com diferentes concentrações de BAP e cinetina, no estado semi-sólido ou líquido, após 35 dias de cultivo.

Meio de cultura	Estado do meio	Tipo de explante	Média de brotações/explante
B5B _{1,5} ¹	Semi-sólido	seg. nodal	3,0
B5B _{1,5}	Líquido	seg. nodal	4,1
B5B _{3,0} ²	Semi-sólido	seg. nodal	1,0
B5B _{3,0}	Líquido	seg. nodal	2,3
B5K _{1,5}	Semi-sólido	seg. nodal	2,0
B5K _{1,5} ³	Líquido	seg. nodal	2,9
B5K _{3,0} ⁴	Semi-sólido	seg. nodal	3,0
B5K _{3,0}	Líquido	seg. nodal	1,1
B5B _{1,5}	Semi-sólido	seg. internodal	5,5
B5B _{1,5}	Líquido	seg. internodal	6,2
B5B _{3,0}	Semi-sólido	seg. internodal	1,1
B5B _{3,0}	Líquido	seg. internodal	3,1
B5K _{1,5}	Semi-sólido	seg. internodal	4,1
B5K _{1,5}	Líquido	seg. internodal	1,0
B5K _{3,0}	Semi-sólido	seg. internodal	1,3
B5K _{3,0}	Líquido	seg. internodal	3,9

¹ Meio básico B5 (Gamborg et al., 1968) suplementado com 1,5 mg/l de BAP (6-benzilaminopurina)

² Meio básico B5 (Gamborg et al., 1968) suplementado com 3,0 mg/l de BAP (6-benzilaminopurina)

³ Meio básico B5 (Gamborg et al., 1968) suplementado com 1,5 mg/l de Cinetina

⁴ Meio básico B5 (Gamborg et al., 1968) suplementado com 3,0 mg/l de Cinetina

Melhores respostas para indução de brotações foram obtidas em meio B5 (Gamborg et al., 1968) suplementado com BAP (6-benzilaminopurina) ou cinetina (6-furfurilamino-purina) a 1,5 mg/l (Fig. 78), tanto no estado semi-sólido como líquido. Ressalta-se que explantes do tipo internodal apresentaram maior número de brotações.

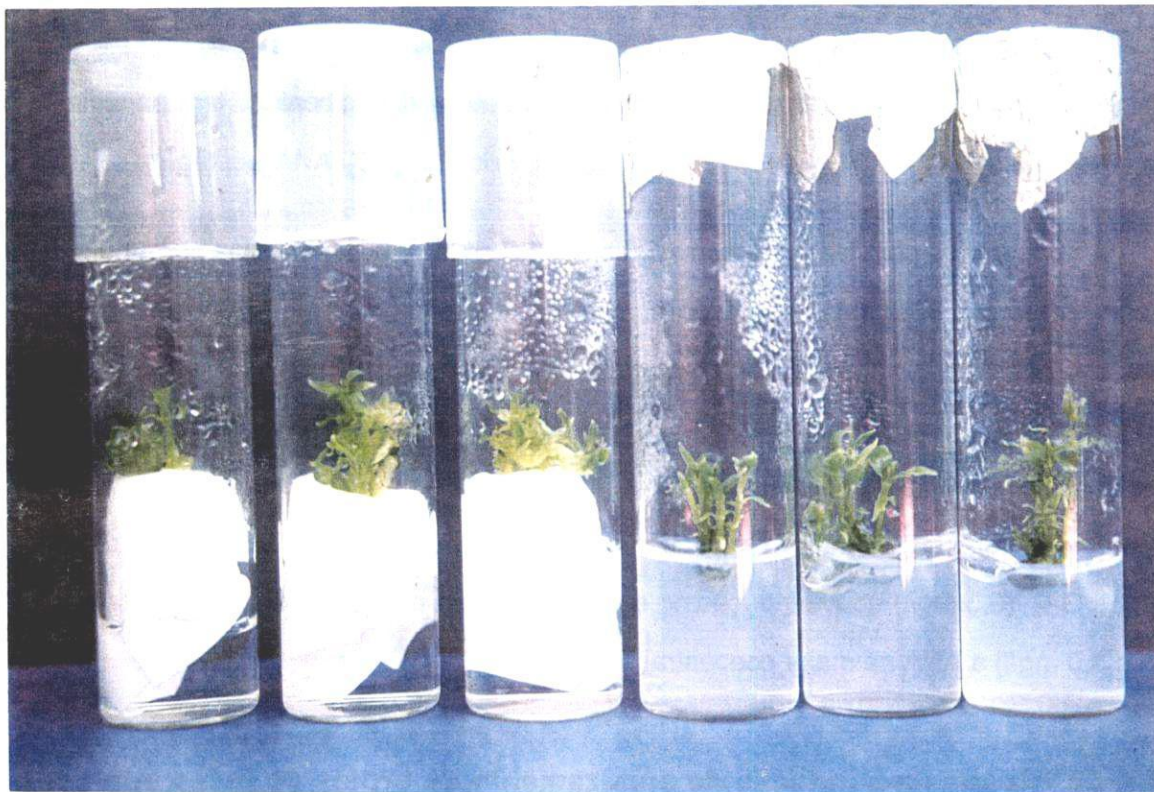


FIG. 78 - Indução de brotações a partir de segmentos nodais e internodais de ipeca.

Para alongamento, brotações com tamanho inferior a 1,0cm, foram transferidas para meio B5 semi-sólido, suplementado com ácido giberélico (GA_3 ; 0,0; 0,3; 0,5 e 1,0 mg/l). A Tabela 51 mostra as respostas obtidas, após 36 dias de cultivo, quanto ao incremento de crescimento médio dos brotos, utilizando-se 40 brotos por tratamento.

TABELA 51 - Crescimento de broto de ipeca em meio B5 suplementado com diferentes concentrações de ácido giberélico (GA_3), após 36 dias de cultivo.

GA_3 (mg/l)	Crescimento médio (mm)
0,0	17,04
0,3	20,66
0,5	22,66
1,0	26,95

Para essa etapa, à medida em que se aumentou a concentração de GA₃ (0,0 a 1,0 mg/l), maior foi o incremento de crescimento, mostrando que o ácido giberélico tem papel importante no alongamento de brotos.

Os brotos com tamanho entre 1,0 cm e 2,0 cm foram transferidos para meio B5 semi-sólido, carvão ativado 0,1%, suplementado com ácido giberélico (0,3 mg/l) combinado com ácido naftalenoacético (ANA 0,1, 1,0 e 5,0 mg/l) ou ácido indolilbutírico (AIB 0,1, 1,0 e 5,0 mg/l) ou sem auxina. Neste caso, como mostra a Tabela 52, após 35 dias de cultivo, há tendência da combinação GA₃ e ANA ser mais eficiente para enraizamento, porém com menor número de raízes por plântula, enquanto que na combinação AIB e GA₃ observou-se maior número de raízes por broto. Utilizando-se somente GA₃ (0,3 mg/l) houve indução de raízes, mas com número inferior às concentrações de AIB (0,1 a 5,0 mg/l) e ANA na maior concentração (5,0 mg/l).

TABELA 52 - Resposta à indução de enraizamento de brotos de ipeca submetidos a meio B5 suplementado com ácido giberélico (GA₃ 0,3 mg/l) combinado a diferentes concentrações de ANA ou AIB após 35 dias de cultivo.

Meio de cultura ¹	Nº de broto enraizado	Nº de broto não-enraizado	Nº médio de raiz/broto
Testemunha ²	9/19	10/19	5,33
AIB 0,1	8/20	12/20	7,20
AIB 1,0	5/19	14/19	7,00
AIB 5,0	8/19	11/19	7,75
ANA 0,1	13/20	7/20	4,20
ANA 1,0	9/19	10/19	5,25
ANA 5,0	5/20	15/20	7,00

¹ Meio básico de B5 (Gamborg et al., 1968) suplementado com GA₃ e ANA ou AIB a 0,1; 1,0 ou 5,0 mg/l.

² Meio de cultura sem regulador de crescimento.

Por outro lado, quando os brotos apresentavam tamanho superior a 2,0 cm foram transferidos para o meio com metade da concentração de sais de MS (MS/2) suplementado com AIB (0,1; 1,0 ou 5,0 mg/l) ou ANA (0,1; 1,0 ou 5,0 mg/l). As respostas após 38 dias de cultivo estão demonstradas na Tabela 53.

TABELA 53 - Resposta de brotos de ipeca em meio com metade dos sais de MS (MS/2), suplementado com AIB ou ANA, após 38 dias de cultivo.

Tratamento ¹ (MS/2)	Nº de brotos	Nº de plântulas bem enraizadas	Nº de plântulas pouco enraizadas	Brotos sem raiz	Eficiência enraizamento (%)
Testemunha ²	15	4	4	7	53,33
ANA _{0,1}	17	5	2	10	41,18
ANA _{1,0}	15	6	1	10	46,67
ANA _{5,0}	22	5	2	15	31,82
AIB _{0,1}	22	2	5	15	31,82
AIB _{1,0}	16	10	0	6	62,50
AIB _{5,0}	21	10	5	6	71,43

¹ Meio de cultura com metade dos sais básico de MS suplementado com ANA ou AIB a 0,1; 1,0 ou 5,0 mg/l.

² Meio de cultura sem regulador de crescimento.

Conforme os dados da Tabela 53, em todos os tratamentos foi possível obter enraizamento (Fig. 79), entretanto, foi conseguida maior eficiência de enraizamento em meio suplementado com AIB (1,0 e 5,0 mg/l).



FIG. 79 - Enraizamento de brotos de ipeca.

Para aclimação das plântulas obtidas, inicialmente foram lavadas em água corrente e transplantadas para copos de plástico (capacidade 300 ml) com substrato formado por terra preta, serragem e esterco de curral na proporção de 1:2:1. As condições de aclimação foram de alta umidade, em germinador totalmente fechado com plástico, durante uma semana (Fig. 80). Após esse período foram transferidas para sacos de plástico de polietileno, com o mesmo substrato, nos quais permaneceram até o crescimento e formação de mudas. As mudas de ipeca foram transferidas para o campo e estão desenvolvendo-se normalmente (Fig. 81).

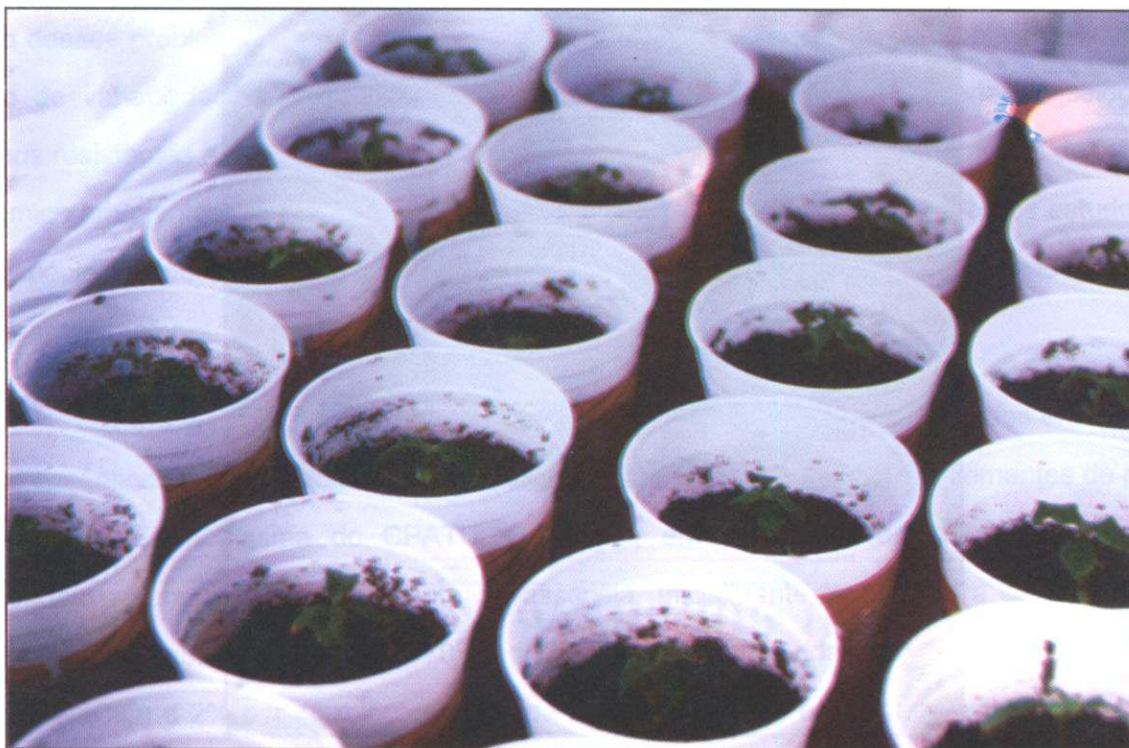


FIG. 80 - Aclimação de plântulas de ipeca provenientes de micropropagação.



FIG. 81 - Plantas de ipeca em campo, provenientes de micropropagação.

- Pimenteira-do-reino

Dentre as espécies cultivadas na região amazônica, a pimenteira-do-reino ocupa lugar de destaque, com uma área de cultivo acima de 20 mil hectares e cerca de 25 mil toneladas por ano. Entretanto, desde meados da década de 60, esta cultura vem sofrendo sérios prejuízos devido à ocorrência da doença fusariose, que constitui-se num dos fatores limitantes ao cultivo, assim como os elevados custos com manutenção.

O melhoramento convencional não tem alcançado êxito, haja vista a falta de genótipos resistentes e/ou tolerantes a essa enfermidade, assim como pela dificuldade de introdução de novos germoplasmas do centro de diversidade. Apesar da espécie *Piper colubrinum* L. apresentar resistência à fusariose, a obtenção de híbridos por métodos convencionais, entre essas duas espécies, é muito difícil.

As técnicas de cultura de tecidos apresentam-se como uma alternativa promissora na solução desses problemas, seja através da conservação e intercâmbio de germoplasma *in vitro*, na indução de variabilidade genética, micropropagação clonal de genótipos superiores, seleção de genótipos resistentes e/ou tolerantes a fatores bióticos e abióticos, introdução de genes de interesse agrônômico em plantas, obtenção de híbridos somáticos, dentre outras. O objetivo dos estudos com essa espécie foi desenvolver sistemas de regeneração de plantas *in vitro* visando auxiliar os programas de melhoramento genético.

Para viabilizar o início do processo, considerando as sérias dificuldades em conseguir material asséptico de plantas crescidas diretamente no campo, foram coletadas sementes de plantas do Banco de Germoplasma do CPATU, Belém,PA, em seguida lavadas em água corrente, despulpadas e submetidas a tratamento de assepsia. Inicialmente, sob câmara de fluxo laminar asséptica, foram imersas em álcool a 70% por 2 minutos e transferidas para solução de hipoclorito de sódio (NaClO) a 2% por 15 minutos e lavadas, posteriormente, com água destilada autoclavada por cinco vezes e, por fim, inoculadas em meio básico de MS (Murashige & Skoog, 1962), 3% sacarose, 0,7% ágar e pH 5,8. As sementes foram cultivadas sob condições de temperatura de 25°C \pm 2°C e fotoperíodo de 16 horas de luz por oito horas de escuro. As sementes germinaram e desenvolveram plântulas (Fig. 82) após 30 dias de cultura.



FIG. 82 - Obtenção de plântulas de pimenta-do-reino a partir de sementes cultivadas *in vitro*.

- Propagação a partir do ápice caulinar

Os ápices caulinares provenientes de plântulas *in vitro* quando cultivados em meio MS, suplementado com 6-benzilaminopurina (BAP 2,0mg/l), em condições de temperatura de $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, fotoperíodo de 16 horas de luz por oito horas de escuro e intensidade luminosa de 3.000 lux, induziram de três a cinco brotos por explantes a partir de 30 dias de cultivo (Fig. 83). As brotações foram alongadas, em mesmo meio básico, mas suplementados com ácido gibenélico (GA_3 0,3mg/l) com cerca de 25 a 40 dias, e ao serem transferidas para o mesmo meio, mas com ácido naftalenoacético (ANA 0,5mg/l), enraizaram (Fig. 84). As plântulas aclimatadas em câmara úmida, em substrato de solo e matéria orgânica, cresceram, formaram mudas e foram plantadas em campo de cultivo.

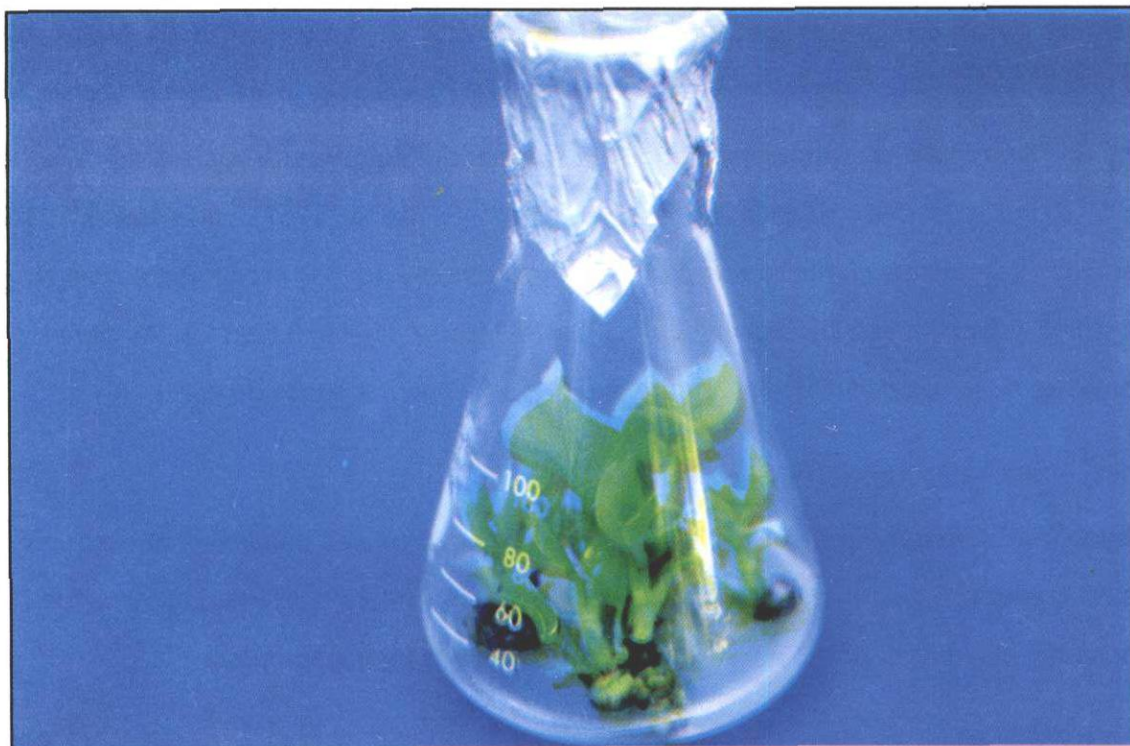


FIG. 83 - Indução de brotações de pimenta-do-reino a partir de ápices caulinares.



FIG. 84 - Enraizamento de brotos de pimenta-do-reino.

- Indução de calos e regeneração de plântulas a partir de segmentos de hipocótilo de plântulas *in vitro*

Os explantes (segmentos de folha e hipocótilo) foram inoculados em tubos de ensaio (100mm X 25mm) com meio semi-sólido MS (Murashige & Skoog, 1962), sacarose 3%, pH 5,8, suplementados com várias combinações de concentrações de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0mg.l⁻¹) e 6-benzilaminopurina (BAP 0,0; 0,2; 0,4 e 0,6mg.l⁻¹). As condições de cultivo foram de ausência de luz e temperatura de 25°C ± 2°C para indução de calos.

Os calos obtidos foram transferidos para meio MS suplementado com ácido 3-indolilacético (AIA 0,5mg/l) mais BAP (1,5 ou 2,5mg/l) e cultivados sob condições de fotoperíodo de 16 horas de luz por oito horas de escuro. Após os calos diferenciarem parte aérea foram transferidos para o mesmo meio, mas suplementado com 0,5mg/l ANA para formação de plântulas.

A indução de calos, a partir de segmentos de folhas apresentou alta taxa de oxidação e baixa formação de calos, porém segmentos de hipocótilo foram mais responsivos aos tratamentos submetidos, pois mesmo havendo oxidação, ocorreu formação de calos em todos os meios (Fig. 85). Ademais, o melhor resultado de formação de calos foi obtido em meio de cultura com 1mg/l 2,4-D e 0,2mg/l BAP. A diferenciação de calos em parte aérea (Fig. 86) foi favorecida quando estes foram cultivados em meio, com maior concentração de BAP (2,5mg/l) e AIA (0,5mg/l), com indícios de que a citocinina tem um papel importante no processo de diferenciação de calos. Uma vez diferenciada a parte aérea a partir de calos, a obtenção de plântulas completa ocorreu quando estas foram transferidas para o meio com auxina (ANA 0,5mg/l), onde formaram raízes (Fig. 87). As plântulas serão aclimatadas em câmara úmida, em substrato com terra preta e serragem, e, posteriormente, transplantadas para sacos de plástico para crescimento e formação de mudas sob casa-de-vegetação.

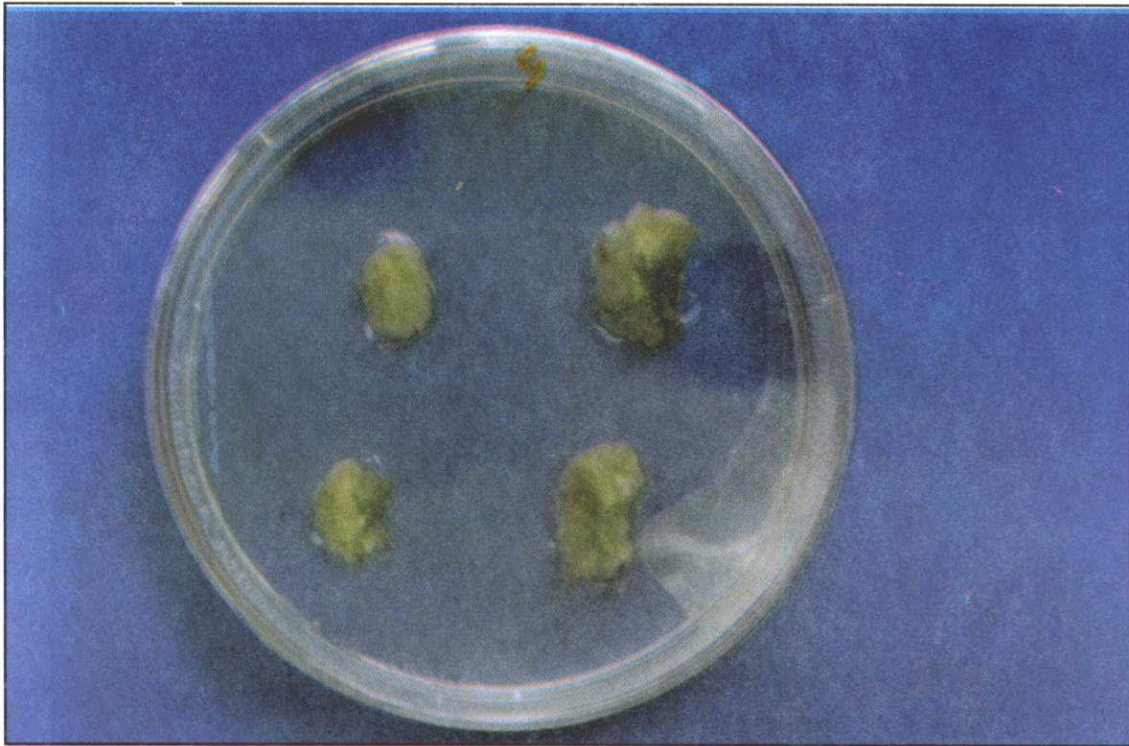


FIG. 85 - Indução de calos de pimenta-do-reino a partir de segmentos de hipocótilo.

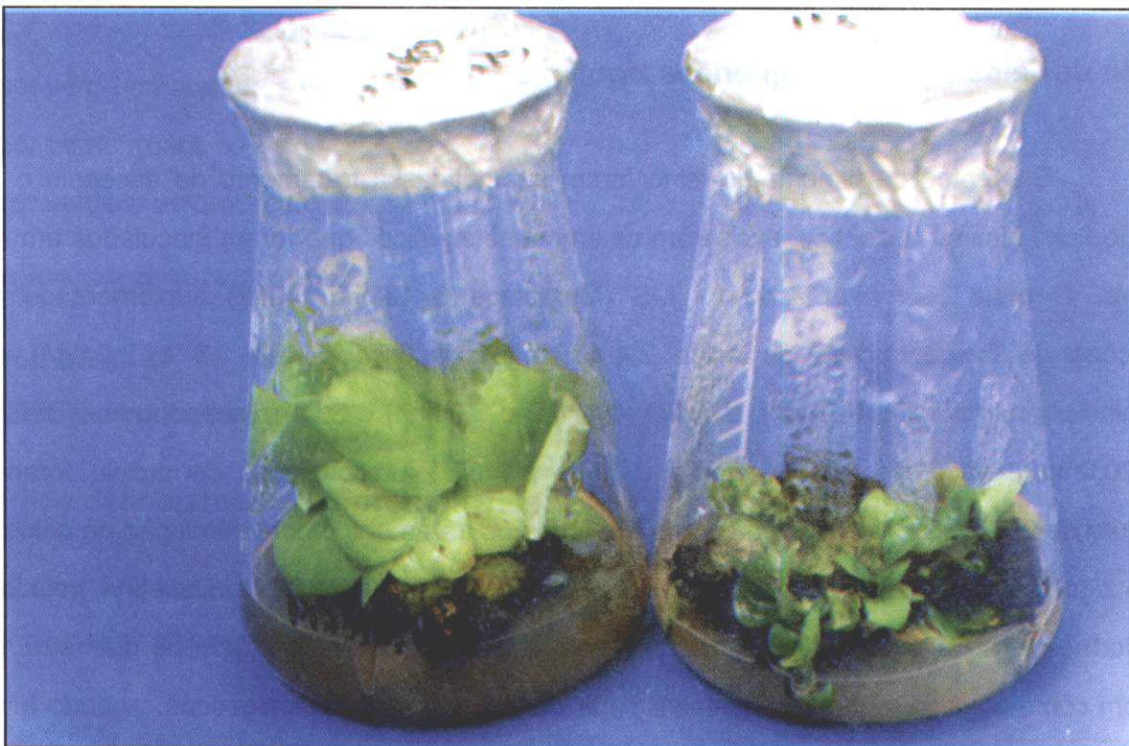


FIG. 86 - Diferenciação da parte aérea a partir de calos de segmentos de hipocótilo de pimenta-do-reino.



FIG. 87 - Formação de raízes em brotos diferenciados de calos de segmentos de hipocótilo de pimenta-do-reino.

- Indução de calos a partir de embriões zigóticos

Sementes de pimenta-do-reino foram submetidas a tratamento de assepsia e, sob câmara de fluxo laminar asséptica, excisaram os embriões zigóticos que foram inoculados em meio de cultura. O meio básico utilizado foi MS (Murashige & Skoog, 1962) suplementado com combinações de concentrações de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D 1,0 e 2,0mg/l) e 6-furfurilamino-purina (cinetina 0,1mg/l), e 2,4-D (0,1; 1,0 e 5,0mg/l) e 6-benzilaminopurina (BAP 1,0; 10,0 e 20,0mg/l), sacarose a 3%, ágar a 0,7% e pH 5,8. As condições de cultivo foram de temperatura de $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ e ausência de luz. Em todos os tratamentos houve indução de calos nos embriões zigóticos, com melhores respostas em meio com 1mg/l 2,4-D e 0,1mg/l cinetina, pois foram mais uniformes e, após 45 dias de cultura, formaram calos com cerca de 1,5cm de diâmetro. Este estudo tem como objetivo regenerar plantas a partir de calos de embriões zigóticos, visando futuros trabalhos para a obtenção de mutantes a partir de sementes irradiadas, com raios gama ^{60}Co .

- Isolamento de protoplastos a partir de folhas de pimenta-do-reino (*Piper nigrum* L.) -

Esta ação de pesquisa tem como objetivo regenerar plantas a partir de protoplastos visando produzir híbridos somáticos pela fusão de protoplastos que serão tolerantes a doenças de fungos ou bactérias.

- Abreviaturas:

2ME - 2-mercaptoetanol; CR10 - celulase "Onozuka" R-10 (Yakult Honsha Co., Tokyo, Japão); CRS - Celulase "Onozuka" RS (como R-10); DTT - (+)-Dithiothreitol; MR-10 - Macerozyme R-10 (como CR-10); MS - Meio de Murashige e Skoog (1962); PVP - Polyvinylpyrrolidone (K=40); Y-23 - Pectoliase Y-23 (Seishin Co., Tokyo, Japão).

- Estádios de desenvolvimento das folhas:

A: cor verde clara, muito delgada e muito tenra;

B: cor verde-amarelada, delgada e muito tenra;

C: cor verde-amarelada a verde, delgada e tenra;

D: cor verde, tenra;

E: cor verde a verde escuro, quase madura.

- Índice de escurecimento:

5+ (controle), 4+, 3+, 2+, +, - (não escurecimento)

Determinado por observação.

- Índice de isolamento de protoplastos:

7+ (bem), 6+, 5+, 3+, 2+, +, - (não)

Determinado por observação em microscópio

- Procedimento para isolamento de protoplasto de pimenta-do-reino:

- . Coleta de folhas (estádio de desenvolvimento de acordo com o experimento);
- . Limpeza das folhas levemente com etanol 70%;
- . Corte das folhas com uma lâmina em pequenos pedaços ($1-4 \text{ mm}^2$) em 10 ml de solução contendo 0,6 M manitol e 5 mM MES (pH 5,7) com 2ME ou DTT numa placa de petri ($150 \times 20 \text{ mm}^2$). As concentrações de 2ME e DTT são especificadas em cada experimento;
- . Incubação dos pedaços de folhas na mesma solução por 2 horas;
- . Transferência dos pedaços de folhas para papel filtro para drenar o excesso de solução;
- . Incubação dos pedaços de folhas (1 g/placa) em placas de petri ($60 \times 15 \text{ mm}^2$) com 10 ml de solução de enzima a 21°C por 17 horas em agitação a 40-50 rpm. A formulação das soluções foi especificada em cada experimento.
- . Após suave agitação das placas de petri para suspensão dos protoplastos, filtrar a solução para becher de 50ml, utilizando Calbiochem, CA., USA;
- . Transferência, para tubos de centrifuga cônico de 15 ml;
- . Centrifugação a 400-500 rpm (80-100 Xg) por 10 minutos;
- . Remoção do sobrenadante com pipetas de 2 ml;
- . Ressuspensão dos protoplastos em 1 ml de solução de lavagem (mesma solução usada quando de cortes) em tubos de centrifuga cônico de 15 ml;
- . Se requerido, deve ser centrifugado em 5 ml de solução de sacarose 1,5 M contendo 5 mM MES (pH 5,7) e 5 mM DTT.

A primeira etapa deste estudo foi determinar qual a substância que evitaria o escurecimento das folhas. Foram usadas folhas no estágio C, solução de corte 0,6M manitol, 5mM MES (pH 5,7) e 2ME ou DTT. Foi usado 100 ml de solução para cada 10-13 g de materiais de folha (5-7 folhas). A solução de enzima continha 1/2 MS; 0,35M manitol; 0,35M sorbitol; 5mM MES (pH 5,7); 0,1 % Y-23; 1,0 % CR-10, e 2ME (0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 e 9 $\mu\text{l}/10 \text{ ml}$), ácido cítrico (0, 5, 10, 20 e 50 mM), DTT (0, 5, 10, 20 e 50 mM) ou PVP (0, 1, 2 e 3 %). 2ME foi muito efetivo contra escurecimento porém, este pareceu ser tóxico para as células, pois muitas romperam-se em solução com 2ME (a partir de 5mM). Então, DTT (a partir de 5 mM) foi preferível como um produto químico contra o escurecimento a ser usado em isolamento de protoplastos de pimenta-do-reino (Tabela 54).

TABELA 54 - Resposta de tecido foliar ao escurecimento submetido a diferentes anti-oxidantes em solução para isolamento de protoplastos de pimenta-do-reino.

Tratamento	Concentração	Índice de escurecimento
PVP (%)	0	5 +
	1	5 +
	2	4 +
	3	3 +
Ácido cítrico	0	5 +
	5	5 +
	10	4 +
	20	3 +
	50	2 +
DTT (mM) ¹	0	5 +
	1	3 +
	2	+
	3	-
	.	.
	.	.
	50	-
2 ME (mM) ²	0	5 +
	1	4 +
	2	4 +
	3	3 +
	4	+
	5	-
	.	.
	.	.
	.	.
	9	-

¹ Na concentração acima de 3mM até 50mM DTT os resultados foram semelhantes.

² Na concentração acima de 5mM até 9mM 2ME os resultados foram semelhantes.

Na segunda etapa avaliaram-se os efeitos de solução de enzimas em folhas no estágio C, cortadas em 100ml de solução 0,6M manitol, 5mM MES (pH 5,7), para cada 10-13 g de materiais de folha (5-7 folhas) com 50 µl 2ME. A solução de enzimas continha 1/2 MS; 0,35M manitol; 0,35M sorbitol; 5mM MES (pH 5,7) em combinações de CR-10 (0,3; 0,5 ou 1,0 %) e MR-10 (0,3; 0,5 ou 1,0 %); CR-10 (1,0; 2,0 e 3,0 %) e MR-10 (0,3; 0,5 ou 1,0 %); e CR-10 (0,3; 0,5 ou 1,0 %) e Y-23 (0,03; 0,05 ou 0,1 %). Neste caso, Y-23 foi mais efetiva que MR-10 quando combinada com CR-10, mas Y-23, em alguns casos, apresentou efeitos tóxicos aos protoplastos. Entretanto, quando comparou-se os efeitos de Y-23 (0,03; 0,05 ou 0,1 %) combinado com CR-10 (0,3; 0,5 ou 1,0 %) ou CRS (0,3; 0,5 ou 1,0 %), CR-10 foi mais efetiva que a CRS (Tabela 55).

TABELA 55 - Índice de isolamento de protoplastos de mesofilo foliar em solução de enzimas com pectoliase Y-23, combinada com Celulase R-10 ou Celulase RS, após 17 h de incubação.

Solução (%)	(%)	Y-23 (%)		
		0,03	0,05	0,1
CR-10	0,3	+	+	2+
	0,5	3+	3+	4+
	1,0	3+	3+	3+
CRS	0,3	+	+	+
	0,5	+	+	2+
	1,0	2+	2+	2+

Na terceira etapa avaliaram-se os efeitos do estágio de desenvolvimento de folha sobre o isolamento de protoplastos e escurecimento do material. Os estádios de folhas foram A, B, C, D e E, cortadas em 100ml de solução com 1/2MS; 0,6M manitol; 5mM MES (pH 5,7), para cada 2-5g de material de folha (2-4 folhas) com 5mM DTT. Em outro experimento foi adicionado DTT a várias concentrações (15mM para folhas no estágio A, 10mM para folhas no B, e 5mM para folhas nos estádios C e D). Para o isolamento de protoplastos, as soluções de enzimas testadas foram 1/2MS; 0,35M manitol; 0,35M sorbitol; 5mM MES (pH 5,7); 0,1% Y-23; 1,0% CR-10 e 3mM DTT; e

1/2MS; 0,35M manitol; 0,35M sorbitol; 5mM MES (pH 5,7); 0,1% Y-23; 1,0% CR-10 com DTT adicionado a várias concentrações (15mM para folhas no estágio A, 10mM para folhas no estágio B, e 5mM para folhas nos estádios C e D). Quando foram usadas folhas no estágio A, as células foram facilmente rompidas e o material para isolamento de protoplastos não foi bom. Os protoplastos foram isolados a partir do estágio B e as células, após tratamento com solução enzimática, apresentaram elevada viscosidade e difícil ressuspensão. As folhas no estágio C foram boas para isolar protoplastos, entretanto também apresentaram muita viscosidade e de difícil ressuspensão após o tratamento. O número de protoplastos isolados de folhas no estágio D foi menor do que aqueles dos estádios B e C. Contudo, não apresentaram tanta viscosidade e os protoplastos foram fáceis de ressuspensão em solução (Tabela 56).

TABELA 56 - Respostas de tecido foliar de diferentes estádios de desenvolvimento, ao escurecimento e ao isolamento de protoplastos, sob ação de solução enzimática com diferentes concentrações de DTT.

Estádio de desenvolvimento de folhas	A	B	C	D	E
Índice de escurecimento ¹	3+	1+	-	-	-
Índice de isol. de protoplastos	-	-	3+	3+	+
Índice de escurecimento ²	-	-	-	-	-
Índice de isol. de protoplastos	+	3+	2+	2+	-

¹Solução de corte com 5mM DTT e solução de enzimas com 3mM DTT para todos os estádios de desenvolvimento da folha.

²Solução de corte e solução de enzimas com DTT a 15, 10 e 5mM, para folhas nos estádios A, B, C e D, respectivamente.

O potencial osmótico de solução de enzimas testada (0,0; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6; 0,7; 0,8; 0,9 e 1,0M) mostrou que a solução com 0,7M é preferível para o isolamento de protoplastos de folhas de pimenta-do-reino (Tabela 57), sendo a combinação das enzimas Y-23 (0,05%) e CR-10 (0,05%) a mais efetiva (Tabela 58).

TABELA 57 - Efeito de osmose no isolamento de protoplastos.

Osmose (M)	0,0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	1,0
IIP ¹	-	-	-	-	+	3+	4+	4+	4+	4+	4+

¹ Índice de isolamento de protoplastos

TABELA 58 - Índice de isolamento de protoplastos de mesófilo foliar de pimenta-do-reino sob a ação de enzimas Pectoliase Y-23 e Celulase R-10, após 17 h de incubação.

Solução	(%)	Y-23 (%)		
		0,03	0,05	0,1
(%)				
CR-10 (%)	0,3	+	+	2+
	0,5	3+	4+	3+
	1,0	3+	3+	3+

- Castanheira-do-brasil

A castanheira-do-brasil é uma espécie com problemas de germinação por apresentar sementes recalcitrantes, sendo difícil a produção de mudas. Os estudos com micropropagação desenvolveram-se através de testes de assepsia onde foram usados segmentos nodais e internodais de caule e segmentos de folha, como explantes. Estes foram lavados em água corrente com detergente, imersos em etanol a 70%, por 15 segundos, e logo após lavados com água destilada e transferidos para solução de hipoclorito de sódio (NACIO) a 3%, por 15 minutos e, por fim, lavagem em água destilada autoclavada, por três vezes, sob câmara de fluxo laminar.

Os calos de coloração esverdeada iniciaram a indução, após treze dias, em meio MS (Murashige & Skoog, 1962), suplementado com 0,5mg/l AIA, 1,5mg/l BAP e 2% PVP (ácido 3-indolilacético, 6-benzilaminopurina e polivinil-pirrolidona, respectivamente), enquanto os calos de

coloração branca foram obtidos a partir de treze dias de cultura em meio MS, suplementado com 1,0mg/l 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) e 0,5mg/l netina, 6-furfurilamino-purina, (Fig. 88). Após 45 dias de cultura, os calos foram transferidos para meio MS, suplementado com combinações de concentrações de AIA (0,5 e 1,0mg/l) e BAP (1,0 e 3,0mg/l) ou 2,4-D (2,0mg/l) e cinetina (0,5mg/l), com maior crescimento dos calos em meio suplementado com AIA e BAP, porém sem regeneração de plantas.

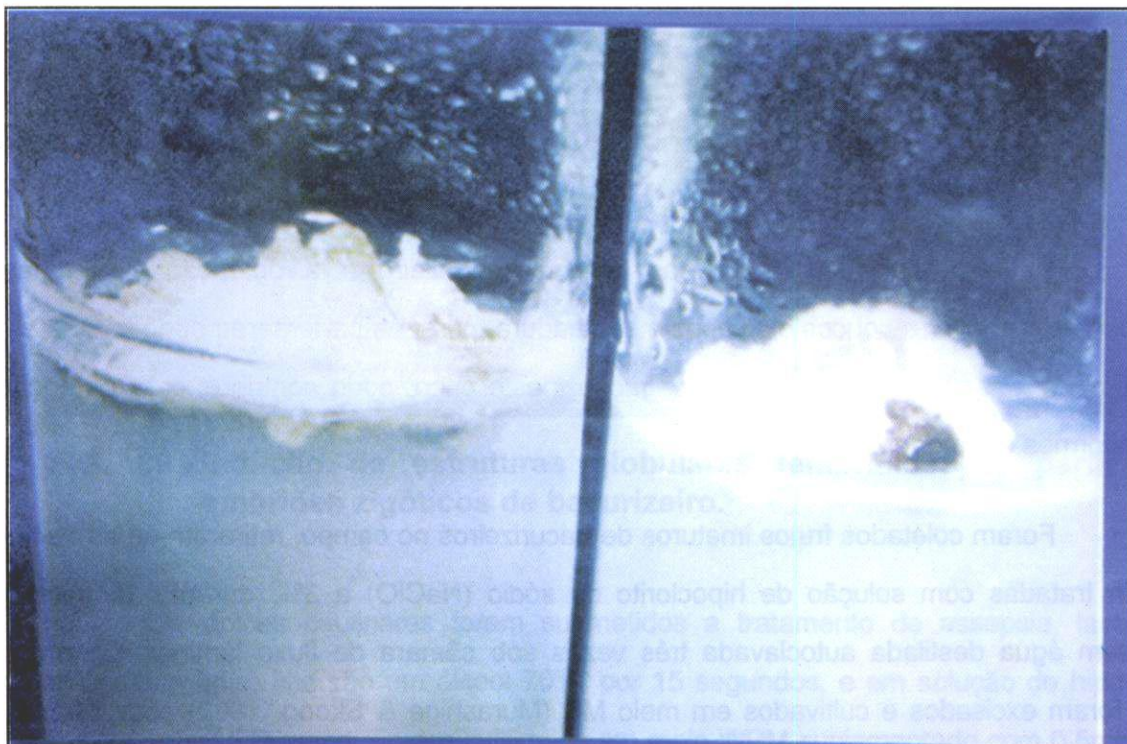


FIG. 88 - Indução de calos a partir de segmentos de caule de castanha-do-brasil.

Os calos de coloração clara a esverdeada, também foram obtidos, apresentando aspecto "friáveis", quando os explantes foram cultivados em meio WPM (Wood Plant Medium) suplementado com 0,5mg/l AIA + 3,0mg/l BAP ou 3,0mg/l BAP. O teste de cultivo de ápices caulinares, em meio WPM, com 2% PVP, indicaram boas respostas. Meristemas contendo dois folíolos foram cultivados em três meios (1/2 MS, MS e WPM), suplementados com 1mg/l BAP + 2% PVP e pH 5,8. Durante duas semanas foram cultivados no escuro e em seguida na presença de luz. Após 20 dias foram avaliados quanto ao crescimento dos folíolos, conforme dados mostrados na Tabela 59.

TABELA 59 - Respostas de ápices caulinares de castanha-do-brasil, em três meios de cultura, após 20 dias de cultivo.

Meio de cultura**1	Número de explante	Explante crescido	Explante oxidado	Contaminação (%)
1/2 MS*	11	5	6	0
MS	10	8	2	0
WPM	10	9	1	0

* Meio de cultura contendo metade da concentração de sais básico de MS (1/2 MS); sais básico completo de MS (MS); e sais básico de Wood Plant Medium (WPM).

- Bacurizeiro

Um dos principais problemas com o bacurizeiro é a obtenção de mudas. O lançamento de raiz ocorre poucos dias após a semeadura, porém a parte aérea pode levar até mais de 500 dias para ser lançada. A micropropagação, neste caso, pode contribuir para obtenção de mudas uniformes em menor tempo.

Foram coletados frutos imaturos de bacurizeiros no campo, retiraram-se as sementes que foram tratadas com solução de hipoclorito de sódio (NaClO) a 3%, durante 15 minutos, e lavadas com água destilada autoclavada três vezes sob câmara de fluxo laminar. Os embriões zigóticos foram excisados e cultivados em meio MS (Murashige & Skoog, 1962) com 1,0mg/l AIA (ácido 3-indolilacético) e 1,0mg/l cinetina (6-furfurilamino-purina). Após 45 dias houve intumescimento de alguns embriões e mudanças de cor, de amarelo para verde e avermelhado. Então, foram transferidos para o mesmo meio, mas suplementado com 2,0mg/l 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) ou 1,0mg/l BAP (6-benzilaminopurina). Os embriões em meio com BAP apresentaram várias pontuações verdes semelhantes a embrióides, conforme mostra a Fig. 89.



FIG. 89 - Indução de estruturas globulares (embrióides) a partir de embriões zigóticos de bacurizeiro.

Os ápices caulinares foram submetidos a tratamento de assepsia, lavagem em água destilada e detergente, imersão em álcool 70%, por 15 segundos, e em solução de hipoclorito de sódio (NaClO) a 2%, por 15 minutos. Foram cultivados em meio WPM suplementado com 0,5mg/l BAP, no qual alguns explantes cresceram e emitiram brotações, como mostra a Fig. 90.

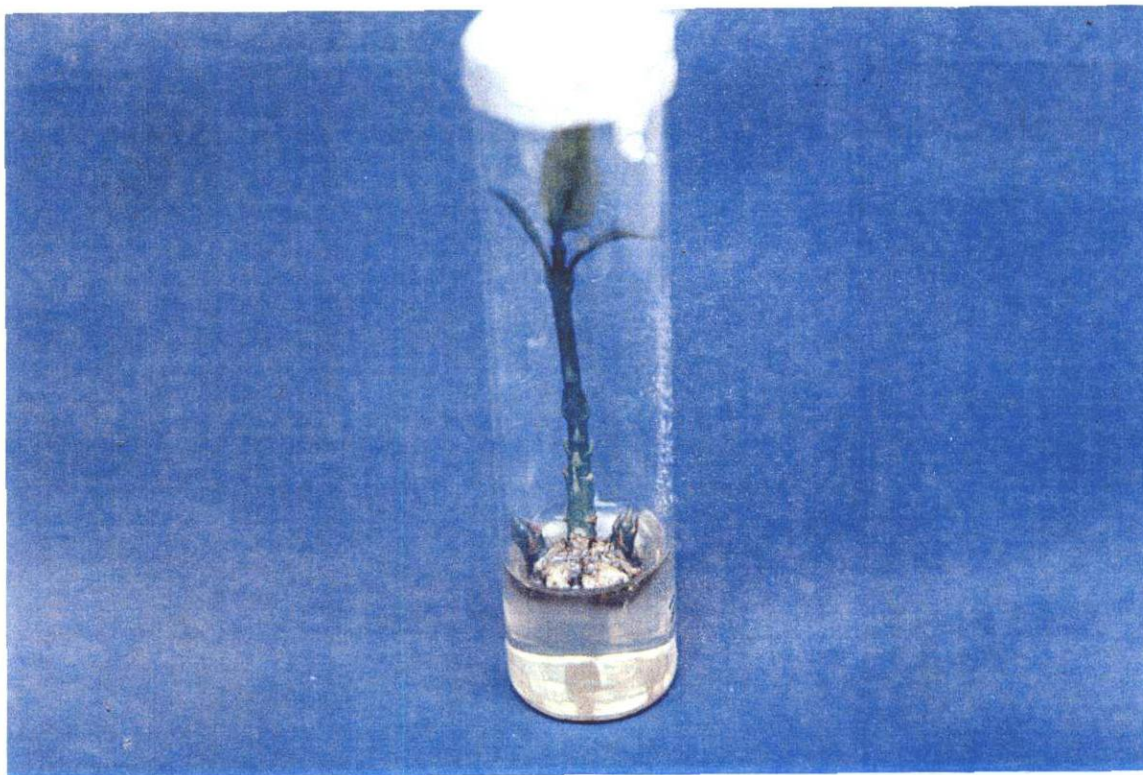


FIG. 90 - Indução de brotações a partir de ápices caulinares de bacurizeiro.

- Urucuzeiro

O urucuzeiro é uma planta arbustiva, cujas sementes produzem corantes, bixina e norbixina, de grande utilização na produção de cosméticos, conservação de alimentos, etc. Apresenta grande variabilidade genética, cor e formato do fruto, produção, teor de corante, porte da planta, constituindo-se, a maioria dos plantios com grande desuniformidade, principalmente devido a propagação ser basicamente através de sementes.

Estudos visando a micropropagação de plantas foram realizados tomando como explantes embriões zigóticos provenientes de sementes maduras de plantas no campo. As sementes foram lavadas e desinfestadas com álcool a 70%, por 5 minutos, e hipoclorito de sódio (NaClO) a 1%, por 15 minutos. O meio de cultura usado foi o MS (Murashige & Skoog, 1962), suplementado com diferentes concentrações de 2,4-D (0,25; 0,50 e 1,0mg/l); cinetina (0,50mg/l); AIA (0,25 e 0,50mg/l); BAP (1,0; 2,0 e 4,0mg/l); AIB (1,0; 2,0 e 4,0mg/l), (ácido 2,4-diclorofenoxiacético;

6-furfurilamino-purina; ácido 3-indolilacético; 6-benzilaminopurina; ácido indolilbutírico, respectivamente) pH 5,8, e condições de cultivo sob temperatura de $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, fotoperíodo de 16 horas de luz por oito horas de escuro, intensidade de iluminação de 3.000 lux e umidade relativa do ar de aproximadamente 70%.

A indução de calos ocorreu em meio com 2,4-D (0,5mg/l) e cinetina (0,5mg/l) ou 2,4-D (1,0mg/l) e cinetina (0,5mg/l) os quais originaram embriões sob a mesma condição de cultivo, quando transferidos para meio sem regulador de crescimento ou suplementado com 0,25mg/l AIA. Os embriões, uma vez transferidos para o meio com AIB a 1,0 e 4,0mg/l, atingiram o estágio de plântulas. Ressalta-se que embriões somáticos foram induzidos, diretamente de embriões zigóticos, sem passar pela fase de calos, em meio MS, sem regulador de crescimento, ou quando suplementado com 0,25mg/l 2,4-D.

Os melhores resultados para indução de calos foram observados quando embriões zigóticos foram cultivados em meio MS suplementado com 1,0mg/l 2,4-D e 0,5mg/l cinetina; maior quantidade de formação de embriões somáticos quando em meio com 0,25mg/l AIA, e conversão de embriões somáticos em plântulas em meio com 1,0mg/l AIB. Ademais, a adição de 0,25mg/l 2,4-D, em meio MS, apresentou-se como eficiente na indução de embriogênese somática direta. A Fig. 91 mostra a regeneração de plântulas de urucuzeiro, via embriogênese somática, a partir de embriões zigóticos de sementes maduras.



FIG. 91 - Regeneração de plantas de urucuzeiro, via embriogênese somática, a partir de embriões zigóticos de sementes maduras.

- Guaranazeiro

O guaranazeiro, espécie nativa da Amazônia, é uma planta arbustiva, produtora de sementes rica em cafeína, que é amplamente empregada na indústria de refrigerantes. Apresenta ampla variabilidade genética e é propagada principalmente através de sementes. Para os estudos de micropropagação, através de técnicas de cultura de tecidos, foram realizados testes de assepsia usando-se como explantes ápices caulinares de lançamentos novos, a partir de plantas do BAG da EMBRAPA-CPATU. Os explantes foram lavados em água corrente e submetidos a choque térmico, mergulhando-os alternadamente em água esterilizada a 5 °C e 50 °C. Em câmara de fluxo laminar asséptica foram tratados com solução de hipoclorito de sódio (NaClO), a várias concentrações (2,0; 3,0; 3,5 e 4,0%), durante 15 minutos e, posteriormente, lavados em água autoclavada por 3-5 vezes.

Os resultados não foram satisfatórios pois não se conseguiu explantes assépticos. O desenvolvimento do trabalho foi prejudicado, tornando evidente a necessidade das matrizes serem cultivadas sob casa-de-vegetação, para, a partir dessas plantas, serem obtidos explantes.

- Açaizeiro

O açaizeiro é uma das palmeiras mais típicas do Pará. Sua maior ocorrência é no estuário do rio Amazonas, em terrenos de várzea, de igapó e na terra firme. Tem grande importância alimentar e econômica para a região (alimento e indústria de palmito), especialmente entre as classes média e baixa, tendo ocorrência por toda a região, desde o Maranhão às Guianas e Venezuela. Entretanto, devido à exploração indiscriminada para palmito, está sendo ameaçado de perda de grande parte da variabilidade genética.

A propagação clonal, para esta espécie, se constituiem um entrave para a multiplicação de genótipos superiores, pois ocorre basicamente através de sementes. Para micropropagação clonal, pontas de raízes novas (explantes) foram submetidas a testes de assepsia, lavando-os em água corrente e com detergente, seguida de termoterapia, colocando o material em estufa a 40°C, durante cinco minutos, ou a choque térmico, imersão em água a 5°C e a 50°C, alternadamente. Em câmara de fluxo laminar asséptica foram tratados com solução de hipoclorito de sódio (NaClO) a 0,5; 2,0 e 3,0%, durante dez a quinze minutos, e, posteriormente, lavados com água destilada autoclavada antes de serem inoculados em meio de cultura com metade dos sais básico de MS (MS/2). As Tabelas 60 e 61 mostram a eficiência de tratamento de assepsia usando termoterapia e choque térmico, antes da imersão em solução de hipoclorito de sódio.

TABELA 60 - Assepsia de explantes de açazeiro, previamente submetidos à termoterapia, a tratamentos com hipoclorito de sódio e a diferentes tempos de exposição após 15 dias de cultura.

NaClO (%)	Tempo (min.)	Explante com contaminação	Explante sem contaminação	Eficiência (%)
0,5	10	10	0	0
0,5	15	8	2	20
2,0	10	5	5	50
2,0	15	8	2	20
3,0	10	8	2	20
3,0	15	8	2	20

TABELA 61 - Assepsia de explantes de açazeiro, previamente submetidos a choque térmico, a tratamentos com hipoclorito de sódio e a diferentes tempos de exposição, após 15 dias de cultura.

NaClO (%)	Tempo (min.)	Explantes com contaminação	Explantes sem contaminação	Eficiência (%)
2,0	10	10	0	0
2,0	15	10	0	0
3,0	10	5	5	50
3,0	15	9	1	10
4,0	10	5	5	50
4,0	15	7	3	30

Os dados sugerem para tratamento de assepsia de explantes (ponta de raízes novas) com termoterapia, solução de hipoclorito de sódio a 2,0%, por dez minutos, enquanto com choque térmico, solução de hipoclorito de sódio a 3,0 e 4,0% durante dez minutos. Entretanto, os dados não foram confirmados devido, principalmente, à natureza dos explantes, pois dificilmente se consegue

explantes nas mesmas condições de plantas no campo. Portanto, para controle e obtenção de explantes mais praticável para assepsia, é necessário o desenvolvimento de plantas em casa-de-vegetação.

Os explantes livres de contaminação foram transferidos para meio básico B5 (Gamborg et al., 1968), suplementado com 1,5mg/l BAP (6-benzilaminopurina), no qual intumesceram mas não diferenciaram-se.

Outro estudo desenvolvido com esta espécie foi a regeneração de plantas, a partir de embriões zigóticos, cujo objetivo maior, devido à recalcitrância das sementes, foi obter plântulas via embrião zigótico de sementes submetidas à secagem rápida (flash-dry), seguido de armazenamento em câmara fria.

As sementes foram despulpadas e lavadas em água, sob câmara de fluxo laminar asséptica e imersas em álcool a 70%, por cinco minutos, seguidas de imersão em hipoclorito de sódio a 2%, por quinze minutos, e lavagem em água destilada autoclavada por várias vezes. Os embriões foram excisados e colocados durante alguns minutos em solução de polivinilpirrolidona (PVP 0,5 e 2,0%), ácido ascórbico (0,15 e 0,3%) e ácido cítrico (150 a 250mg/l) para evitar oxidação. Posteriormente, foram inoculados em meio básico para embrião (ME) contendo macro e micronutrientes, vitaminas, caseína hidrolisada, ágar 1% e pH 5,8. Após quatorze dias houve lançamento da parte aérea e das raízes, sendo então transferidos para o mesmo meio, suplementado com ácido 3-indolilacético (AIA 2,5mg/l) para desenvolvimento.

Por outro lado, os embriões foram cultivados em meio MS (Morashige & Skoog, 1962) semi-sólido, modificados com 0,17g/l NaH_2PO_4 , carvão ativado 0,2%, pH 5,8 suplementado com várias combinações de ANA e BAP (0,1; 0,5 e 1,0mg/l). A Tabela 62 mostra os resultados obtidos após 30 dias de cultivo, sob condições de fotoperíodo 16 horas de luz por oito horas de escuro, intensidade de iluminação de 3.000 lux e temperatura de $25^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$.

TABELA 62 - Respostas de embriões zigóticos de açaizeiro em meio MS modificado, com diferentes combinações de ANA e BAP, após 30 dias de cultivo.

Tratamento (Meio MS ¹)	Classificação das respostas			
	Desenvolvimento de plântula	Desenvolvimento atrofiado	Sem resposta	Contaminação (%)
B _{1,0} N _{1,0}	05	00	04	00
B _{0,5} N _{1,0}	4	3	2	1
B _{0,1} N _{1,0}	6	2	1	1
B _{1,0} N _{0,5}	5	4	1	0
B _{0,5} N _{0,5}	7	3	0	0
B _{0,1} N _{0,5}	1	4	5	0
B _{1,0} N _{0,1}	2	5	1	1
B _{0,5} N _{0,1}	4	1	4	0
B _{0,1} N _{0,1}	3	1	5	1
Testemunha ²	1	6	1	2

¹ Sais básico e vitaminas de MS, 0,17 g/l NaH₂PO₄, carvão ativado 0,2%, pH 5,8, suplementado com BAP (B 0,1; 0,5 e 1,0mg/l) e ANA (N 0,1; 0,5 e 1,0mg/l).

² Meio de cultura sem regulador de crescimento.

Os dados obtidos demonstraram que um balanço hormonal, com maior concentração de auxina (1,0mg/l ANA), em relação à citocinina (0,1mg/l BAP), favoreceu o desenvolvimento do embrião a converter-se em plântulas (Fig. 92). Por outro lado, concentrações semelhantes de auxina (0,5 ou 1,0mg/l ANA) e citocinina (0,5 ou 1,0mg/l BAP) favoreceram mais a conversão de embriões zigóticos em plântulas, enquanto meio sem reguladores de crescimento não permitiram boa formação de plântulas e os embriões tenderam a atrofiarem-se.

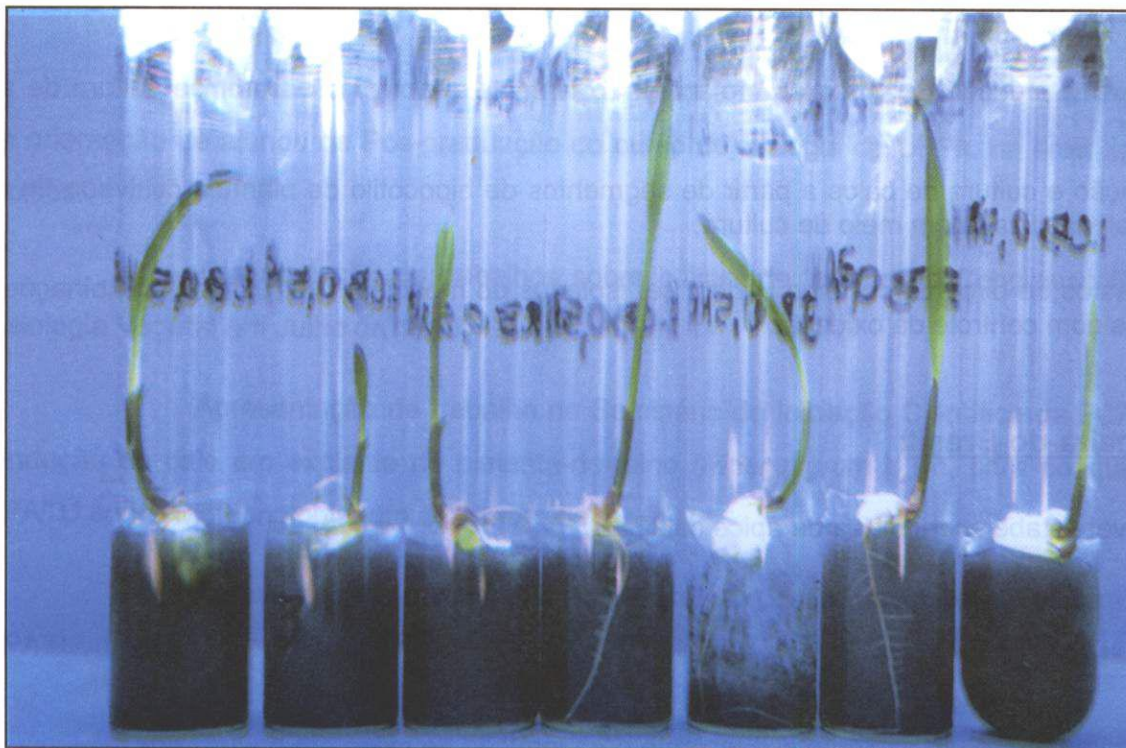


FIG. 92 - Obtenção de plantas de açazeiro a partir de embriões zigóticos de sementes maduras.

Conclusões preliminares

Os resultados obtidos neste projeto permitem o estabelecimento das seguintes conclusões:

Quina:

- É possível estabelecer as técnicas de obtenção de calo de explante de campo.

Ipeca:

- Múltiplas brotações e regeneração de plântulas a partir de segmentos nodais são obtidas em cultura "in vitro".

Pimenteira-do-reino:

- É possível a indução de múltiplas brotações de pimenteira-do-reino a partir de cultura de ápice caulinar;
- A obtenção e cultura de calos a partir de segmentos de hipocótilo de plântula cultivada "in vitro" pode ser viabilizada em meio de cultura;
- Protoplastos de pimenta-do-reino podem ser isolados do mesófilo foliar usando combinações de enzimas com controle da oxidação.

Castanheira-do-Brasil:

- É possível estabelecer cultura de ápice caulinar.

Bacurizeiro:

- Embrião imaturo, é um explante conveniente para indução de calos em bacurizeiro;
- Ápices caulinares de bacurizeiro podem ser estabelecidos em culturas.

Urucuzeiro:

- Regeneração de plântulas via embriogênese somática a partir de embriões zigóticos é obtida em cultura "in vitro".

Açaizeiro:

- Embriões zigóticos podem produzir calos "in vitro";
- Plântulas a partir de embriões zigóticos podem ser obtidas em meio de cultivo com combinações de reguladores.

Difusão de tecnologia

- Informação dos resultados alcançados a bolsistas da FCAP e da UFPa, e quando da orientação de alunos de Pós-graduação do curso de Biologia da UFPa, na área de cultura de tecidos.
- Apresentação de trabalhos sobre cultura de tecidos no Congresso Brasileiro de Fisiologia Vegetal em Julho de 1993.
- Apresentação de trabalho no Seminário de Iniciação Científica da FCAP/UFPa — "Indução de calo em explante de pimenta-do-reino (*Piper nigrum* L.) e, para pesquisadores do CPATU sobre Biotecnologia, em dezembro de 1992.
- Apresentação do seminário sobre "Resultados de pesquisa em cultura de tecidos. CPATU, 1991".
- Divulgação dos resultados através da imprensa em forma de entrevistas para a TVS e TV Cultura sobre cultivo de plantas medicinais "in vitro" e propagação de ipeca.
- Apresentação de trabalhos no XLIV Congresso Brasileiro de Botânica. 1993:
 - . Embriogênese somática em Urucu.
 - . Propagação de plantas medicinais através de técnicas "in vitro".
 - . Propagação clonal de *Cephaelis ipecacuanha* A. Richard através de cultura de tecidos.
- Apresentação de trabalho no "V Congresso Brasileiro de Fisiologia Vegetal" Minas Gerais, 1995.
- Curso prático em cultura de tecidos de plantas, ministrado para professores e pesquisadores da UFPa, FCAP, UFMA, UFCE, UFPI, CEPLAC e CPATU em novembro de 1992 e novembro de 1993.
- Workshop EMBRAPA-CPATU/JICA, do Projeto "Geração de tecnologia agroindustrial para o desenvolvimento do trópico úmido". Título do trabalho: "Regeneração a partir de calo em pimenta-do-reino" em março de 1994.
- Curso de cultura de tecido de planta ministrado na I Semana de Pós-graduação da FCAP em abril de 1995.

PLANTAS MEDICINAIS

COLETA, PROPAGAÇÃO E AVALIAÇÃO DE PLANTAS MEDICINAIS DA AMAZÔNIA

Irenice Alves Rodrigues¹
Sérgio de Mello Alves²
Olinto Gomes da Rocha Neto³
Edson José Artiaga de Santiago⁴
Claudio José Reis de Carvalho³
Hiroyuri Kamakura⁵
Osamu Shiota⁵
Hiromasa Izumi⁵
Takashi Watanabe⁵
Kiichiro Kawaguchi⁵

Resumo: O processo de desenvolvimento da região amazônica requer estratégias apropriadas nos diferentes setores organizados da sociedade, na busca do bem-estar socioeconômico da população. A utilização racional dos recursos naturais passa a ter grande importância nesse contexto, à medida que os produtos florestais, madeireiros e não-madeireiros, passam a ser explorados economicamente. O presente segmento de pesquisa tem por objetivo coletar, conservar e promover a domesticação de espécies medicinais nativas de importância econômica, através de esforço integrado e interdisciplinar, visando indicar materiais genéticos selecionados que possam ser utilizados em sistemas de produção viáveis agronomicamente, com retornos econômicos que garantam a sustentabilidade de áreas agrícolas da região, e a sua utilização como matéria-prima na produção de novos medicamentos sem a destruição do material genético nativo. Foram selecionadas para os estudos iniciais de domesticação as espécies *Cephaelis ipecacuanha* (Ipeca) e *Pilocarpus microphyllus* (Jaborandi), tendo-se coletado materiais botânicos em vários acessos em áreas de ocorrência natural. Foram realizados experimentos para a propagação das espécies, verificando-se que o melhor material para a propagação de ipeca são as estacas de raízes e para o jaborandi, as sementes. Estão sendo conservadas as coleções destas espécies em duas áreas distintas, uma em sub-bosque e outra a pleno sol. Avaliações fitoquímicas periódicas de emetina em ipeca e pilocarpina em jaborandi vêm sendo realizadas nas

¹ Farm. Biol. M.Sc. EMBRAPA-CPATU. Caixa Postal 48, CEP 66.017-970. Belém, PA.

² Quim. Ind. M.Sc. EMBRAPA-CPATU.

³ Eng. Agr. Ph.D. EMBRAPA-CPATU.

⁴ Eng. Agr. EMBRAPA-CPATU.

⁵ Consultor da Japan International Cooperation Agency - JICA. Av. Nazaré 272, Sala 105. Ed. Clube de Engenharia, CEP 66.035-170. Belém, PA.

plantas das coleções, tendo-se adaptadas metodologias para a determinação desses princípios ativos. Foram iniciados estudos agronômicos e fisiológicos, visando à domesticação destas espécies. Está sendo elaborado um "Guia de plantas medicinais, com ênfase nas espécies da Amazônia". Até o momento foram realizadas descrições botânicas, "screening" químico e fotografadas algumas espécies.

COLLECTION, PROPAGATION AND EVALUATION OF MEDICINAL PLANTS OF AMAZONIA

Abstract: The process of development in the Amazon region requires appropriate strategies in the different organized sectors of society, seeking the socio-economic well-being of the population. The rational use of natural resources thus takes on a greater importance in this context, in that, timber and non-timber forest products are able to be harvested economically. The objective of this project is to collect, conserve and promote the domestication of native medicinal species of economic value, through an integrated and multidisciplinary effort, in order to identify selected genetic material that can be utilized in agronomically feasible production systems. This material must provide sufficient economic returns to guarantee the sustainability of agricultural areas in the region, and that their utilization as a raw material for producing new medications does not jeopardize the native genetic material. For the initial studies of domestication were selected the species *Cephaelis ipecacuanha* (Ipeca) and *Pilocarpus microphyllus* (Jaborandi). It was also collected many access on the areas of natural occurrence. Experiments for the propagation of the species were made. The results showed that the best material for ipeca propagation are the stacks of roots and for the jaborandi the seeds. The collections of these species have been preserved in two specific areas, one in shrub and the other at the sun. Periodic phytochemistry evaluations of emetine in ipeca and pilocarpine in jaborandi has been done in plants of the collections. Methodologies were adapted for the determination of those active principles. Agronomical and physiological studies have been done for the domestication of these species. It has been made a "Guide of Medicinal Plants" with emphasis in the Amazonian species. At this moment it was made the plants descriptions, the chemical screening and photographed some of the species.

Objetivo

Selecionar plantas da Amazônia com tradição fitoterapêutica visando utilizá-las como insumo à indústria farmacêutica nacional.

Justificativa

As plantas medicinais oriundas da flora amazônica vêm sendo utilizadas há décadas pela população, sendo que algumas espécies são tradicionalmente usadas em tratamentos fitoterápicos, onde o conhecimento popular tem grande relevância na aplicação dos princípios ativos. Muitas dessas espécies estão passíveis de extinção, seja pela erosão genética provocada pela coleta indiscriminada e/ou pelos freqüentes desmatamentos das áreas de ocorrência natural.

No momento em que a comunidade internacional empenha-se para colaborar na preservação da biodiversidade da floresta amazônica, torna-se oportuno o desenvolvimento de ações de pesquisa que visem, principalmente, promover a domesticação de espécies de valor econômico reconhecido, favorecendo, dessa forma, a preservação e conservação dos recursos genéticos, além de contribuir significativamente para o desenvolvimento regional.

Resultados parciais

Experimento 1 - Coleta, propagação e conservação de *Cephaelis ipecacuanha* (Brot) A. Rich, ipeca; *Pilocarpus microphyllus* Stapf., jaborandi

As espécies medicinais nativas estudadas foram escolhidas com base em critérios que priorizaram o potencial econômico e o risco de erosão genética, evidenciada pelo extrativismo indiscriminado, e pelas alterações provocadas por ações de desmatamentos nas áreas de ocorrência natural.

Com a finalidade de programar as expedições de coleta foram efetuados levantamentos bibliográficos e de herbários, para a obtenção do conhecimento sobre a distribuição geográfica das espécies.

Ipeca

A ipeca (*Cephaelis ipecacuanha* (Brot) A. Rich) pertence à família Rubiaceae, sendo também conhecida cientificamente por *Psychotria ipecacuanha* (Brot) Stokes e, popularmente, como ipecacuanha, ipecacuanha anelada poaia e poaia do mato. É uma planta arbustiva e reptante, cujo habitat natural no Brasil é representado pelas matas dos Estados de Rondônia, Mato Grosso, Pará, Goiás, Minas Gerais, São Paulo, Rio de Janeiro, Espírito Santo, Bahia e Pernambuco.

A importância econômica desta espécie é devida ao seu potencial medicinal, representado pelo alcalóide emetina, sintetizado principalmente nas raízes, além de outros de menor percentagem. É usada como expectorante, no tratamento de diarreias comuns e amebíase. Atualmente, encontra-se em fase de extinção, devido à coleta indiscriminada e à derrubada das matas sob as quais se dá a ocorrência natural da espécie, fatos esses observados em diversos locais onde foram procedidas as coletas realizadas pelo CPATU, quando foi constatado o desaparecimento de várias populações. Essa situação determinou a necessidade de se conservar parte da variabilidade genética da espécie fora do ambiente natural (conservação ex-situ), tarefa essa iniciada no Brasil pelo CPATU.

As coletas de germoplasma de ipeca foram realizadas em quatro expedições botânicas nas áreas de ocorrência natural da espécie, nos Estados de Mato Grosso, Rondônia, Espírito Santo, Minas Gerais e Bahia. Coletaram-se sementes, mudas, estacas (de raiz e caule), além de amostras para a herborização e análises fitoquímicas (Tabela 63).

Tabela 63 - Quantificação do material genético de Ipeca coletado em diferentes regiões brasileiras e introduzidas no BAG de plantas medicinais do CPATU

Locais	Nº de acessos
MATO GROSSO	
Barra do Bugre	15
Salto do Céu	03
Cáceres	01
Mirassol	01
Novo Horizonte	01
Pontes de Lacerda	01
Vila Bela SSM ^a Trindade	01
Tangará da Serra	03
Rio Branco	01
Total	27
RONDÔNIA	
Rolim de Moura	21
Costa Marques	12
Cacoal	01
Cerejeiras	01
Total	35
ESPÍRITO SANTO	
Linhares	03
Lajinha	01
Total	04
RIO DE JANEIRO	
Ponciuncula	02
MINAS GERAIS	
Caratinga	02
BAHIA	
Bicará	01

Após vários experimentos verificou-se que o melhor material para propagação foram as estacas de raízes, cortadas em pedaços de aproximadamente 7cm de comprimento, colocadas inclinadas em câmara úmida, em substrato de areia lavada, onde permaneceram por cerca de 90 dias. Em seguida foram transplantadas, deixadas em viveiro por um período de 180 dias, sendo em seguida transferidas para as áreas de plantio definitivo – sub-bosque, com espaçamento de 30cm x 40cm; e em canteiros semi-sombreados e irrigados, com espaçamento de 25cm x 25cm.

Os primeiros testes com plantas estabelecidas em canteiros foram realizados em 1992, sendo estes localizados na encosta da mata, de modo que as plantas mesmo estando a “Céu Aberto”, recebiam apenas a radiação direta por cerca de seis horas diárias. Os canteiros foram preparados com esterco de gado curtido, e as plantas irrigadas por gotejamento.

Os resultados preliminares mostraram algumas vantagens desse sistema sobre o plantio no sub-bosque (simulação do habitat natural), principalmente no que diz respeito a maior produtividade do sistema radicular. Nessas condições, obteve-se em oito meses um volume radicular só conseguido aos 24 meses nos plantios de sub-bosque (18 gr / planta). Além disso, a facilidade observada na operação de coleta das raízes nos canteiros, contrasta com as dificuldades observadas na mesma operação quando o plantio é no sub-bosque, onde o entrelaçamento das raízes de Ipeca com outras do sistema, provoca perdas de tempo e de material botânico.

Do sistema de plantio em canteiros a pleno sol por meio dia, evoluiu-se para o plantio de canteiros cobertos por palhas (folhas de palmeiras) ou por canteiros estabelecidos sob coberturas com plantas trepadeiras, como por exemplo o maracujá (*Passiflora edulis*), de acordo com a Fig. 93.



FIG. 93 - Ipeca em canteiros semi-sombreados e irrigados.

É notório no caso da Ipeca, que a relação radiação X nutrição da planta deva ser muito bem estabelecida, uma vez que os sintomas visuais de deficiência de nitrogênio em plantas a pleno sol é marcante nessa espécie .

Realizaram-se observações fenológicas nas plantas das coleções, tanto de sub-bosque como de canteiros, verificando-se o florescimento em mais de uma época do ano, porém, a maior incidência ocorreu no período chuvoso (janeiro a março), registrando-se a produção de sementes, após cerca de 150 dias do início da floração. As sementes coletadas foram remetidas ao Laboratório de Sementes do CPATU para diversos testes. Os resultados obtidos mostraram que as sementes apresentam germinação extremamente lenta e com acentuada desuniformidade, iniciando a emergência das plântulas aos 130 dias após a sementeira e estabilizando por volta de 560 dias, quando a percentagem de germinação atingiu 66%. É possível que o duro e espesso endocarpo que envolve as sementes seja a causa da dormência verificada nessa espécie. O peso

verificada nessa espécie. O peso de 100 sementes, com umidade de 26,0%, apresentou valor médio de 1,882g e cada fruto continha duas sementes.

As plantas de ipeca que foram transplantadas para os canteiros semi-sombreados e irrigados, no final de 1992 e início de 1993, estão com desenvolvimento normal e regularidade de floração e frutificação, enquanto que as da área do sub-bosque vêm tendo a floração e a frutificação prejudicadas pelo constante ataque de gafanhotos. Estão sendo realizadas observações fenológicas para as fenofases de floração e frutificação (Figs. 94, 95, 96 e 97)

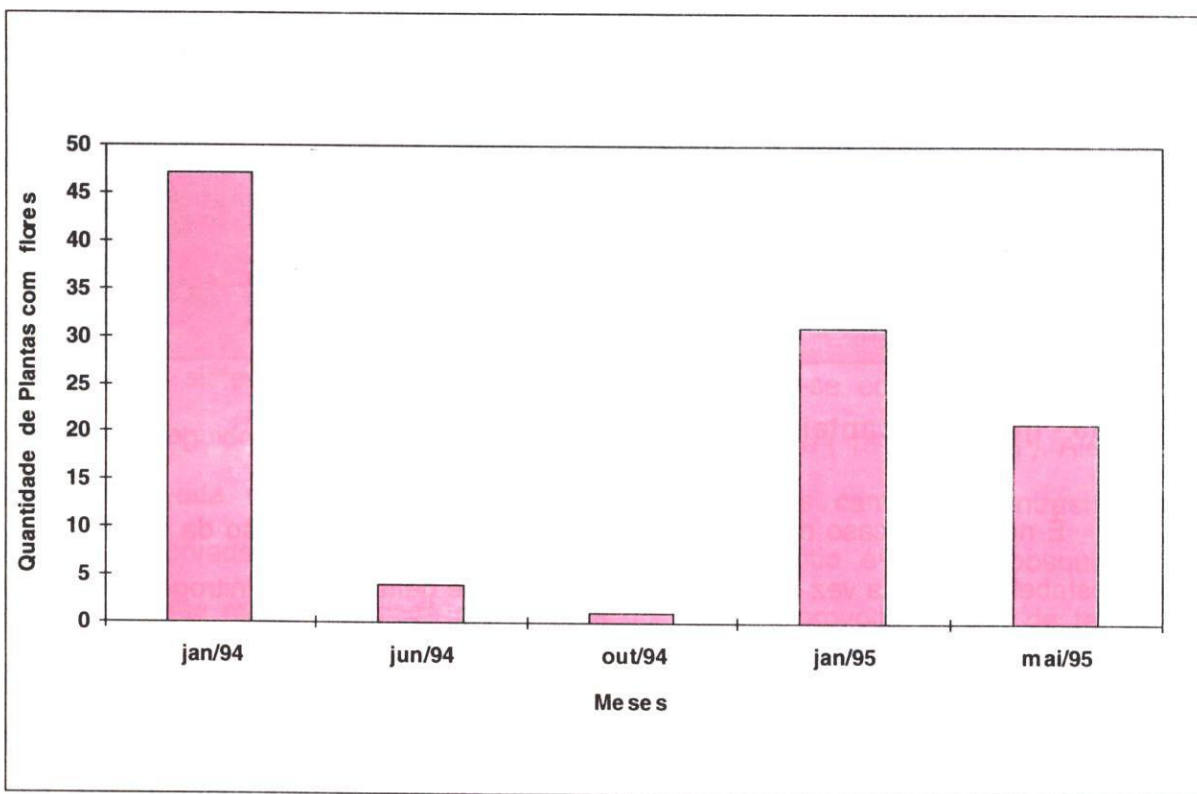


FIG. 94 - Avaliação da floração de ipeca no período de janeiro de 1994 a maio de 1995.

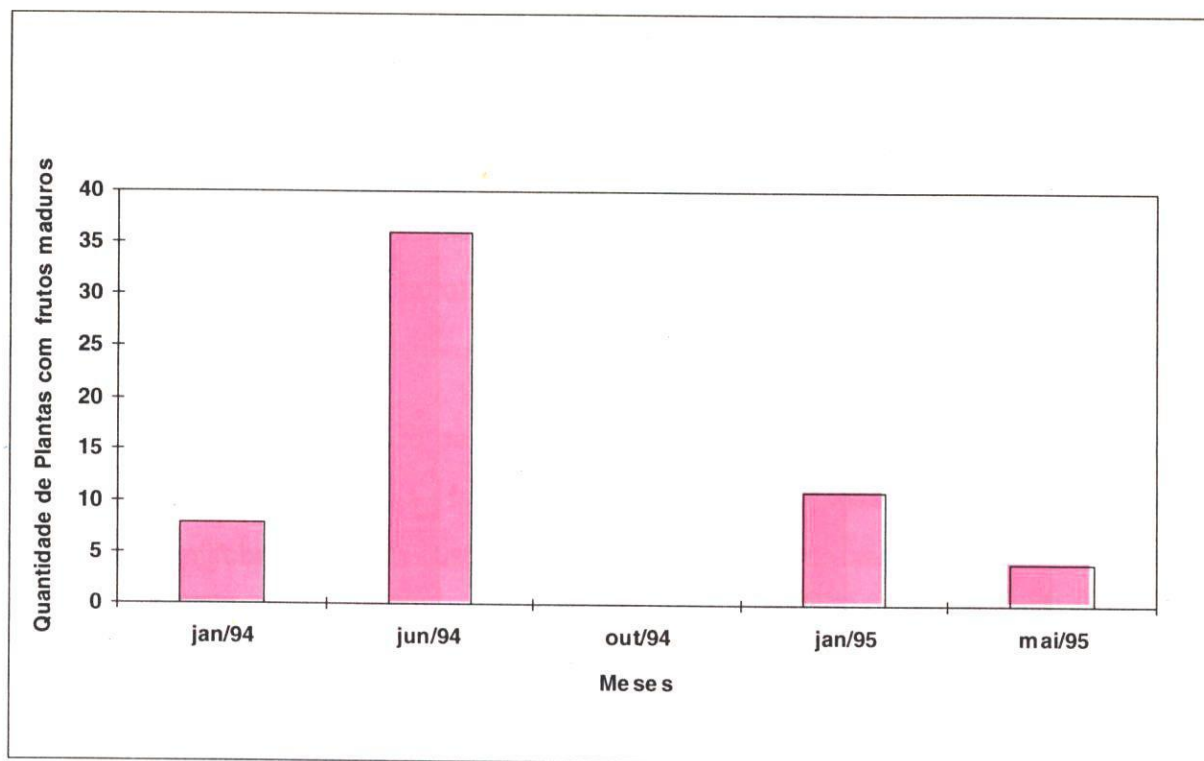


FIG. 95 - Avaliação da frutificação de ipeca no período de janeiro de 1994 a maio de 1995.

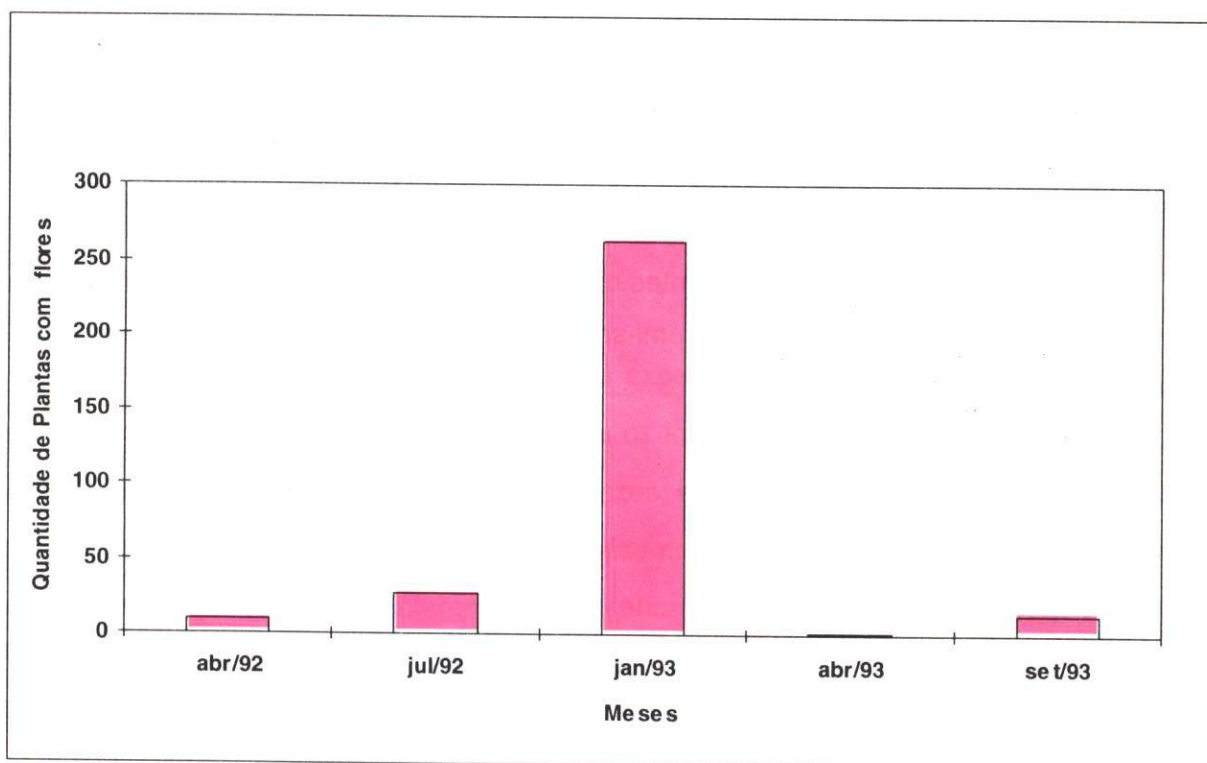


FIG. 96 - Avaliação da floração de ipeca no período de abril de 1992 a setembro de 1993.

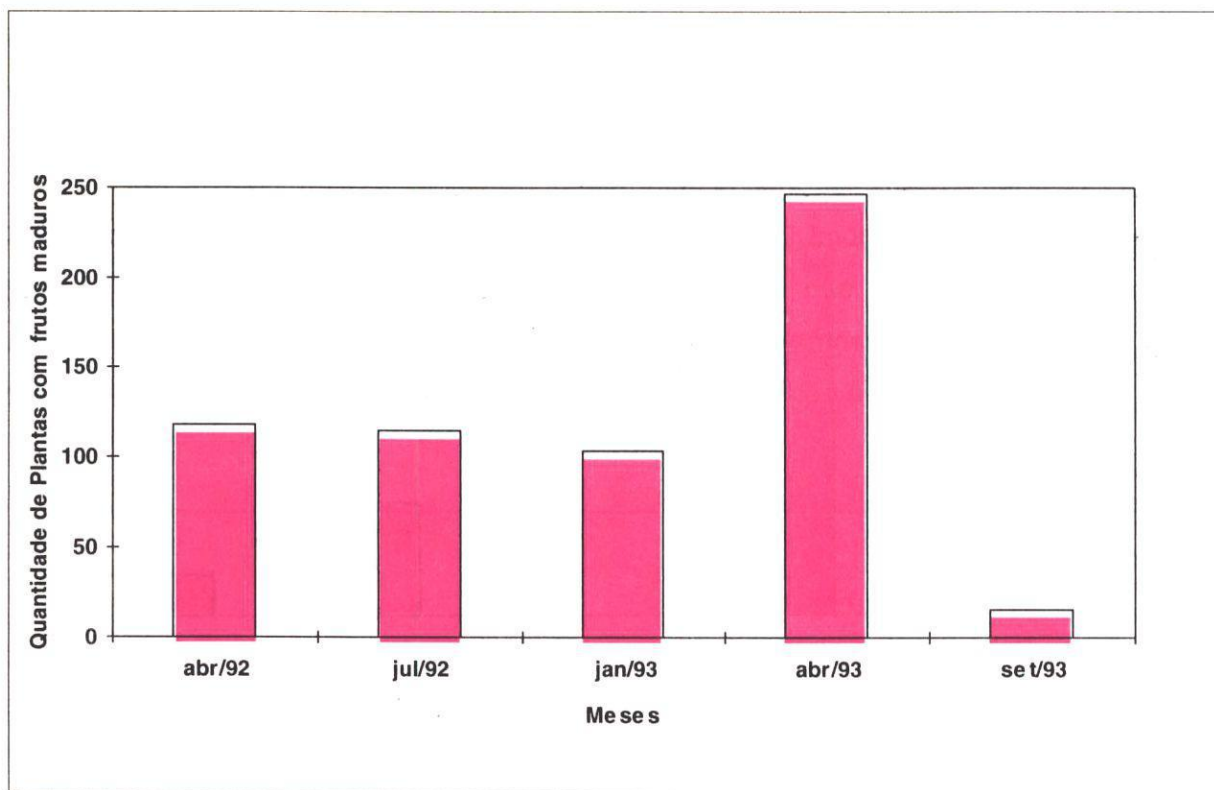


FIG. 97 - Avaliação da frutificação de ipeca no período de abril de 1992 a setembro de 1993

Os estudos de caracterização das diferentes populações de Ipeca coletadas, deverão ser iniciados em 1996, com a utilização de marcadores izoenzimáticos através da técnica de eletroforese, e através do processo convencional de descritores botânicos.

As plantas de ipeca provenientes da micropropagação através da cultura de tecidos estão sendo cultivadas nos canteiros semi-sombreados e irrigados, com desenvolvimento satisfatório.

Jaborandi

O jaborandi (*Pilocarpus microphyllus* Stapf.), também conhecido como joãoborandi, arruda e arataia, pertencente à família Rutaceae, é uma planta arbustiva a subarbórea, com 2,5m a 6,0m de altura e habitat natural em mata aberta e campinarana dos Estados do Pará e Maranhão.

O valor econômico da planta é devido a um dos alcalóides contidos nas folhas, a pilocarpina. Desde muito tempo as folhas dessa espécie são usadas em forma de chá, como anti-infecciosas e antifebrífugas, e industrialmente, na confecção de xampu e mais recentemente na composição de medicamentos oftalmológicos, recomendados na forma de colírios para o tratamento do glaucoma.

A sobrevivência do jaborandi está ameaçada devido à coleta indiscriminada e destruidora para comercialização das folhas, em armazéns de revenda no Estado do Maranhão ou compradores de folhas no Estado do Pará.

Da mesma forma como ocorreu com a ipeca, procurou-se viabilizar a conservação do germoplasma de jaborandi no CPATU. Em 1991, iniciaram-se as coletas de germoplasma em áreas de ocorrência natural, nos Estados do Maranhão (Açailândia, Mata Roma, Brejo e Santa Quitéria) e do Pará (Serra dos Carajás, áreas da Companhia Vale do Rio Doce-CVRD), tendo sido coletadas apenas sementes.

Em 1992 foram realizadas duas expedições, uma à Serra do Carajás e outra ao município de Moju (fazenda Maisa). Em ambos os locais foram coletadas estacas da parte aérea, além de plântulas obtidas sob as plantas matrizes, em decorrência da inexistência de sementes. As estacas foram utilizadas em testes de enraizamento, sendo tratadas com fitohormônio (Ácido Indol Butírico), porém, apresentaram taxa de enraizamento muito baixa (20%). As mudas das plântulas foram enviveiradas e as mais uniformes utilizadas em testes de respostas a diferentes níveis de luminosidade, observando-se que as melhores taxas de crescimento foram constatadas em plantas sob sombrite com 50% de interceptação de luz.

Em 1993 foram coletadas na Serra dos Carajás poucas sementes, algumas plântulas e material para análise fitoquímica e preparo de exsicatas.

Em junho de 1994 foram recebidas da Serra dos Carajás algumas sementes que produziram mudas, no momento enviveiradas em sacos de polietileno.

No final de julho de 1994 foi realizada uma expedição de coleta abrangendo as regiões de Altamira, Breu Branco e Moju, no Estado do Pará. Em Altamira só foram coletadas folhas para análise fitoquímica, uma vez que não haviam sementes. Nos outros locais foram coletadas sementes e plântulas, além de folhas para análises fitoquímicas.

No período de 1991 a 1994 foi coletado um total de 35 acessos de jaborandi, conforme está demonstrado na Tabela 64.

TABELA 64 - Locais de coleta e material coletado de jaborandi

Primeira coleta (julho de 1991)	Material coletado/ quantidade		Segunda coleta (julho de 1992)	Material coletado/ quantidade	
Pará (Moju e Parauapebas - Serra dos Carajás)	Sementes	659	Pará (Moju e Parauapebas - Serra dos Carajás)	Estacas Mudas	30 575
Maranhão (Brejo, Sta. Quitéria, Mata Roma, Açailândia)	Sementes	625			
Terceira coleta (Junho de 1993)	Material coletado/ quantidade		Quarta coleta (Junho de 1994)	Material coletado/ quantidade	
Pará (Parauapebas - Serra dos Carajás)	Sementes Mudas	156 139	Pará (Parauapebas - Serra dos Carajás, Moju, Novo Breu Branco)	Sementes Mudas	513 142

As sementes apresentaram percentual de germinação satisfatório (em torno de 80%) e o início da germinação ocorreu entre dez a quinze dias, porém, com 30 dias, as plântulas foram repicadas para sacos de polietileno, onde permaneceram aproximadamente 100 dias em viveiro semi-sombreado.

As plântulas apresentaram um padrão de crescimento e desenvolvimento lento, porém, com poucos registros de perdas. O transplântio para a área definitiva foi realizado no período chuvoso, uma vez que foram registradas perdas de plantas já estabelecidas no campo, durante o período de estiagem, provavelmente devido ao estresse hídrico.

Uma parte das plantas da primeira coleta foi transplantada para área de sub-bosque, consorciada com a ipeca; a outra, para área de céu aberto, consorciada com bananeiras, além de um outro grupo, cultivado em plantio isolado com espaçamento de 2,50m x 2,50m (Fig. 98).



FIG. 98 - Jaborandi, em sub-bosque, consorciado com ipeca.

Verificou-se pequena perda de plantas nas áreas de céu aberto, principalmente naquelas consorciadas com bananeiras, devido ao ataque de nematóides e insetos . Entretanto, apresentaram desenvolvimento melhor que as do sub-bosque, já tendo iniciado a floração e a frutificação.

Na área de sub-bosque não foram registradas perdas, todavia, as plantas apresentam pouco desenvolvimento.

Atualmente o BAG de jaborandi conta com 35 acessos. E, além das plantas do Banco de Germoplasma (BAG), foram estabelecidas no campo, a céu aberto, outras espécies medicinais de interesses econômico-regionais e introduzidas, constituindo uma coleção de trabalho (horto de espécies medicinais mais utilizadas pela população), que poderá subsidiar futuros estudos, com o fornecimento de material botânico (Tabela 65 e Fig. 99).

Na área de sub-bosque não foram registradas perdas, todavia as plantas apresentam pouco desenvolvimento.

O manejo e os tratos culturais dispensados às plantas que constituem o BAG de plantas medicinais, estão sendo realizados com base nas informações obtidas em estudos fitotécnicos preliminares, sendo modificados gradativamente à medida em que os estudos agronômicos e fisiológicos forem delineando o sistema de produção mais adequado para cada espécie.

TABELA 65 - Lista das plantas medicinais introduzidas no Horto do CPATU.

Nome científico	Nome vulgar	Família
<i>Hyptis suaveolens</i> Port.	Alfavacão	Labiatae
<i>Portulaca pillosa</i> L.	Amor crescido	Portulacaceae
<i>Dorstenia asaroides</i> Gard.	Apii	Moraceae
<i>Vernonia condensata</i> Baker	Boldo	Compositae
<i>Physalis angulata</i> L.	Camapu	Solanaceae
<i>Costus spicatus</i> (Jacq.)s.w.	Canarana	Zingiberaceae
<i>Pseudocalymma alliaceum</i> Sandw.	Cipó d' alho	Vitaceae
<i>Cissus sicyoides</i> L.	Cipó-pucá	Vitaceae
<i>Plafia glomerata</i> (Spreng.) Peterson	Corrente	Amaranthaceae
<i>Symphytum officinale</i> L.	Confrei	Boraginaceae
<i>Maytenus elcifolia</i> Mart.	Espinheira Santa	Celastraceae
<i>Cordia verbenacea</i> D.C	Erva-baleeira	Boraginaceae
<i>Cajanus cajan</i> (L.) Mill	Feijão-guandu	Leguminosae
<i>Zingiber officinalis</i> Rosc.	Gengibre	Zinziberaceae
<i>Cephaelis ipecacuanha</i> (Brot.) A. Rich.	Ipeca	Rubiaceae
<i>Pilocarpus microphyllus</i> Stapf.	Jaborandi	Rutaceae
<i>Eupatorium triplinerve</i> Vahl	Japana branca	Compositae
<i>Elephantopus scaber</i> L.	Lingua-de-vaca	Compositae
<i>Ocimum minimum</i> L.	Mangericão	Labiatae
<i>Eltheuterina plicata</i> Herb.	Marupazinho	Iridaceae
<i>Chenopodium ambrosioides</i> L.	Mastruço	Chenopodiaceae
<i>Evolvulus</i> sp.	Melhoral	Convolvulaceae
<i>Petiveria alliacea</i> L.	Mucura caá	Phitolacaceae
<i>Pogostemon heyneanus</i> Benth.	Oriza	Labiatae
<i>Arrabidaea chica</i> Verlot.	Pariri	Bignoniaceae
<i>Vitex agnus castus</i> L.	Pau d'angola	Verbenaceae
<i>Sambucus nigra</i> L.	Sabugueiro	Caprifoliaceae
<i>Croton cajuçara</i> Benth.	Sacaca	Euphorbiaceae
<i>Hyptis crenata</i> Pohl	Salva-do-marajó	Labiatae
<i>Unxia camphorata</i> L.	São João	Compositae
<i>Mikania humilifolia</i> DC.	Sucuriju	Compositae
<i>Himanthanthus sucuba</i> Spruce	Sucuba	Apocynaceae
<i>Trifolium medium</i> L.	Trevo-roxo	Papilionaceae
<i>Scoparia dulcis</i>	Vassourinha	Scrophulariaceae
<i>Borreria verticillata</i> (Gen.) Hayer	Vassoura-de-botão	Rubiaceae



FIG. 99 - Visão do horto de plantas medicinais.

Considerações sobre a elaboração do “Guia de Plantas Medicinais Nativas da Amazônia”

Com o objetivo de consolidar as informações sobre plantas medicinais nativas da Amazônia, geradas durante a vigência do projeto, foi acertada, entre representantes do CPATU e da JICA, a elaboração de um Guia de Plantas Medicinais Nativas da Amazônia.

Algumas ações conjuntas foram implementadas, como os levantamentos bibliográfico, fotográfico e de herbário. Como resultado desse trabalho, estão disponíveis parte dos 490 slides de plantas, além da compilação de uma série de informações que deverão ser processadas.

Experimento 2 - Análise fitoquímica de plantas medicinais

Para a quantificação da emetina na raiz da ipeca foi introduzido, testado e aprovado o seguinte método: pesar 20mg de amostra seca e moída, agitar com 0,5ml de hidróxido de amônio a 10% por um minuto, depois juntar 5ml de éter etílico e agitar por cinco minutos; e retirar 1ml da parte etérea e evaporar até a secura; em seguida dissolver em 1ml de metanol e analisar em HPLC.

A coluna utilizada é de ODS, a uma temperatura de 40°C e o solvente é a mistura de acetonitrila e ácido trifluoracético a 0,1%, na proporção de 18 para 82, respectivamente, com a vazão de 1ml/min. O detector utilizado é o de fluorescência e o comprimento de onda Ex 283nm e Em 318nm.

O método para determinação de emetina já está sendo utilizado rotineiramente no Laboratório de Agroindústria do CPATU.

Algumas amostras extraídas da coleção do CPATU foram analisadas e apresentaram os seguintes resultados de acordo com a Tabela 66.

TABELA 66 - Resultados analíticos de amostras de ipeca da coleção do CPATU.

Amostra	Idade/meses	Emetina (%)
Cacoal RO 819-P5	22	0,60
Barra do Bugres MT 690-P3	34	0,70
Barra do Bugres MT 589-P6	47	0,66
Costa Marques RO 612-P5	47	0,63
Costa Marques RO 840-P3	22	0,62
Costa Marques RO 839-P8	22	0,69
Costa Marques RO 838-P9	22	0,63
Rio Branco MT 714-P10	34	0,71
Rio Branco MT 712-P5	34	0,61
Barra do Bugres MT 695-P3	34	0,64
Ibicaraí BA Kamakura 767-2 Sub-bosque	51	0,73
Porciuncula Rio Canteiro Kamakura 745-9	12	0,55
Rolim de Moura RO Kand Canteiro 808-8	12	0,61
Caratinga MG 751-4	51	0,66
Linhares ES 760-4	51	0,74
Tangará da Serra MT 702-4 Sub-bosque	55	0,84
Rio Branco MT 719-9 Sub-bosque	55	0,66
Cacoal RO 819-13 Canteiro	12	0,67
Cerejeiras RO 845-16 Canteiro	12	0,67
Ponta Lacerda MT 602-P34	47	0,87
Salto do Céu MT 590-8	47	0,96
Mirassol MT 595-P2	47	0,74
Novo Horizonte MT 596-52	47	0,66
Ponte Lacerda MT 719-P4	34	0,63
Cáceres MT 594-93	47	0,61
Costa Marques RO 837-P6	22	0,67
Costa Marques RO 827-P12	22	0,67
Cerejeira RO 845-P10	22	0,65
Costa Marques RO 826-P5	22	0,64
Cacoal RO 816-P2	22	0,64

- Operações para o isolamento de alcalóides

A metodologia utilizada para o "screening" fitoquímico está baseada em reações de precipitação e coloração. Na Tabela 67 encontram-se os resultados de 27 plantas estudadas.

TABELA 67 - "Screening" fitoquímico de 27 plantas da coleção do CPATU analisadas em outubro, novembro e dezembro de 1994.

Nome vulgar	Mutamba	Caapeba	Quebra-pedra-vermelha
Nome científico	<i>Guazuma ulmifolia</i> HBK	<i>Potomorphe peltata</i> (L.) Miq.	<i>Phyllanthus urinari</i> Aubl.
Família	Sterculiaceae	Piperaceae	Rubiaceae
Parte usada	Folha	Folha	Folha
Teste/resultado			
Ácidos orgânicos	P	P	P
Açúcares redutores	P	N	P
Alcalóides	P	N	N
Antraquinonas	N	P	P
Azulenos	M	M	M
Carotenóides	P	P	P
Catequinas	M	M	M
Depsídeos e depsidonas	M	P	P
Derivados benzoquinonas	N	M	N
Derivados da cumarina	N	N	N
Esteróides e triterpenóides	N	P	P
Flavonóides	P	M	M
Glicosídeos cardíacos	N	M	M
Lactonas	N	M	P
Polissacarídeos	N	N	N
Proteínas e aminoácidos	P	P	N
Purinas	N	N	P
Saponina espumígena	P	P	P
Taninos	P	P	P

P = positivo; N = negativo; M = mascarado

Continua ...

TABELA 67 - Continuação ...

Nome vulgar	S. João-caá	Angico	Sucuba
Nome científico	<i>Unxia camphorata</i> (Spreng) Peters	<i>Anadenanthera</i> <i>peregrina</i> (L.) Benth	<i>Himatanthus</i> <i>sucuuba</i> Spruce
Família	Compositae	Leguminosae – Mimosoideae	Apocynaceae
Parte usada	Folha/raiz	Casca/vagem	Casca
Teste/resultado			
Ácidos orgânicos	P/P	P/P	P
Açúcares redutores	P/P	P/P	P
Alcalóides	N/N	N/N	N
Antraquinonas	N/N	N/N	P
Azulenos	M/P	N/N	N
Carotenóides	P/N	N/N	N
Catequinas	N/N	P/N	P
Depsídeos e depsídonas	P/P	P/N	N
Derivados benzoquinonas	N/N	M/M	N
Derivados da cumarina	N/P	N/N	N
Esteróides e triterpenóides	P/P	N/N	N
Flavonóides	P/P	N/N	N
Glicosídeos cardíacos	N/N	N/N	N
Lactonas	N/N	N/N	N
Polissacarídeos	N/N	N/N	N
Proteínas e aminoácidos	P/N	P/N	N
Purinas	N/N	N/N	N
Saponina espumígena	P/P	P/P	P
Taninos	P/P	P/P	P

P = positivo; N = negativo; M = mascarado

Continua ...

TABELA 67 - Continuação ...

Nome vulgar	Vassoura-de-botão	Verônica-vermelha	Vassourinha
Nome científico	<i>Borreria vermiculata</i> (L.) Meyer	<i>Dalbergia monetaria</i> L.	<i>Scoparia dulcis</i> L.
Família	Rubiaceae	Leguminosae - Papilionoideae	Scrophulariaceae
Parte usada	Raiz	Casca	Raiz
Teste/resultado			
Ácidos orgânicos	P	P	P
Açúcares redutores	P	P	P
Alcalóides	N	N	P
Antraquinonas	N	N	N
Azulenos	N	N	N
Carotenóides	N	N	P
Catequinas	P	N	N
Depsídeos e depsidonas	N	P	P
Derivados benzoquinonas	N	P	M
Derivados da cumarina	N	N	N
Esteróides e triterpenóides	N	N	P
Flavonóides	N	P	M
Glicosídeos cardíacos	N	P	N
Lactonas	N	P	N
Polissacarídeos	N	N	N
Proteínas e aminoácidos	N	N	N
Purinas	N	M	N
Saponina espumídica	P	P	P
Taninos	P	P	P

P = positivo; N = negativo; M = mascarado

Continua ...

TABELA 67 - Continuação ...

Nome vulgar	Graviola	Carambola	Castanha-do-brasil
Nome científico	<i>Annona muricata</i> L.	<i>Averrhoa carambola</i> L.	<i>Bertholletia excelsa</i> H.&B
Família	Anonaceae	Oxalidaceae	Lecythidaceae
Parte usada	Folha	Folha	Umbigo do ouriço
Teste/resultado			
Ácidos orgânicos	P	P	P
Açúcares redutores	P	P	P
Alcalóides	P	P	N
Antraquinonas	N	N	N
Azulenos	N	P	N
Carotenóides	P	P	P
Catequinas	N	P	N
Depsídeos e depsidonas	M	M	P
Derivados benzoquinonas	N	N	N
Derivados da cumarina	N	N	N
Esteróides e triterpenóides	P	P	P
Flavonóides	P	M	P
Glicosídeos cardíacos	N	N	N
Lactonas	N	N	P
Polissacarídeos	N	N	N
Proteínas e aminoácidos	P	P	P
Purinas	P	P	N
Saponina Espumílica	P	P	P
Taninos	P	P	P

P = positivo; N = negativo; M = mascarado

Continua ...

TABELA 67 - Continuação ...

Nome vulgar	Língua-de-vaca	Pau-para-tudo	Ginja ou Pitanga
Nome científico	<i>Elephantopus mollis</i> HBK	<i>Simaba cedron</i> HBK	<i>Eugenia uniflora</i> L.
Família	Compositae	Simarubaceae	Myrtaceae
Parte usada	Folha/raiz	Casca	Folha
Teste/resultado			
Ácidos orgânicos	P/P	P	N
Açúcares redutores	P/P	P	P
Alcalóides	N/N	P	P
Antraquinonas	N/N	N	N
Azulenos	M/P	P	P
Carotenóides	P/N	P	M
Catequinas	N/N	N	P
Depsídeos e depsidonas	M/P	N	M
Derivados benzoquinonas	N/N	N	N
Derivados da cumarina	N/P	N	N
Esteróides e triterpenóides	P/N	P	N
Flavonóides	M/P	N	M
Glicosídeos cardíacos	M/N	N	N
Lactonas	M/N	N	N
Polissacarídeos	N/N	N	N
Proteínas e aminoácidos	P/P	P	P
Purinas	P/N	N	P
Saponina espumílica	P/P	P	P
Taninos	P/P	P	P

P = positivo; N = negativo; M = mascarado

Continua ...

TABELA 67 - Continuação ...

Nome vulgar	Picão	Damiana	Marupazinho
Nome científico	<i>Bidens pilosa</i> L.	<i>Turnera ulmifolia</i> L.	<i>Eleutherine plicata</i> Herb.
Família	Compositae	Turneraceae	Iridaceae
Parte usada	Folha/talo	Folha	Batata
Teste/resultado			
Ácidos orgânicos	P/P	P	P
Açúcares redutores	P/P	P	P
Alcalóides	N/N	N	N
Antraquinonas	P/N	N	N
Azulenos	M/P	M	N
Carotenóides	P/P	P	P
Catequinas	M/N	P	N
Depsídeos e depsidonas	P/P	N	P
Derivados benzoquinonas	N/N	N	N
Derivados da cumarina	N/P	N	P
Esteróides e triterpenóides	P/N	P	N
Flavonóides	M/N	M	N
Glicosídeos cardíacos	M/N	M	N
Lactonas	P/N	P	N
Polissacarídeos	N/N	N	N
Proteínas e aminoácidos	P/N	P	P
Purinas	P/P	P	N
Saponina espumílica	P/P	P	P
Taninos	P/P	P	P

P = positivo; N = negativo; M = mascarado

Continua ...

TABELA 67 - Continuação ...

Nome vulgar	Caamembeca	Sucuriju	Pariri
Nome científico	<i>Polygala spectabilis</i> D.C.	<i>Mikania humilifolia</i> D.C.	<i>Arrabidaea chica</i> Verlot.
Família	Polygalaceae	Compositae	Bignoniaceae
Parte usada	Raiz	Folha	Folha
Teste/resultado			
Ácidos orgânicos	P	P	P
Açúcares redutores	P	N	P
Alcalóides	N	P	P
Antraquinonas	N	N	P
Azulenos	N	N	N
Carotenóides	N	N	P
Catequinas	N	M	N
Depsídeos e depsidonas	P	P	P
Derivados benzoquinonas	N	M	M
Derivados da cumarina	P	N	N
Esteróides e triterpenóides	N	N	P
Flavonóides	N	M	M
Glicosídeos cardíacos	N	M	N
Lactonas	N	M	P
Polissacarídeos	N	N	N
Proteínas e aminoácidos	N	P	P
Purinas	N	N	P
Saponina espumílica	P	P	P
Taninos	N	P	P

P = positivo; N = negativo; M = mascarado

Continua ...

TABELA 67 - Continuação ...

Nome vulgar	Açaí	Pata-de-vaca	Canarana com pelo
Nome científico	<i>Euterpe oleracea</i> Mart	<i>Bauhinia</i> sp.	<i>Costus spicatus</i> (Jacq. SW)
Família	Palmae	Leguminosa-Caesalpinoideae	Zingiberaceae
Parte usada	Caroço	Folha	Folha
Teste/resultado			
Ácidos orgânicos	P	N	P
Açúcares redutores	P	P	P
Alcalóides	N	N	N
Antraquinonas	M	N	N
Azulenos	N	N	N
Carotenóides	N	P	P
Catequinas	M	P	N
Depsídeos e depsidonas	P	N	P
Derivados benzoquinonas	N	N	N
Derivados da cumarina	P	N	N
Esteróides e triterpenóides	N	P	P
Flavonóides	M	N	N
Glicosídeos cardíacos	N	N	N
Lactonas	P	M	N
Polissacarídeos	N	P	N
Proteínas e aminoácidos	P	P	P
Purinas	M	P	N
Saponina espumífrica	P	P	P
Taninos	P	P	P

P = positivo; N = negativo; M = mascarado

Continua ...

TABELA 67 - Continuação ...

Nome vulgar	Canarana sem pelo	Erva Balieira	Inajá
Nome científico	<i>Costus spiralis</i> Rosc.	<i>Cordia verbenacea</i> D.C.	<i>Maximiliana maripa</i> (C. Serra) Drude
Família	Zingiberaceae	Compositae	Palmae
Parte usada	Folha	Folha	Casca do fruto
Teste/resultado			
Ácidos orgânicos	P	N	N
Açúcares redutores	P	P	P
Alcalóides	N	N	N
Antraquinonas	N	N	N
Azulenos	P	N	N
Carotenóides	P	P	N
Catequinas	N	N	P
Depsídeos e depsidonas	N	P	N
Derivados benzoquinonas	N	N	P
Derivados da cumarina	N	N	P
Esteróides e triterpenóides	P	P	P
Flavonóides	N	N	P
Glicosídeos cardíacos	N	N	N
Lactonas	N	N	N
Polissacarídeos	N	N	N
Proteínas e aminoácidos	P	P	P
Purinas	N	N	N
Saponina espumílica	P	P	P
Taninos	N	P	P

P = positivo; N = negativo; M = mascarado

Continua ...

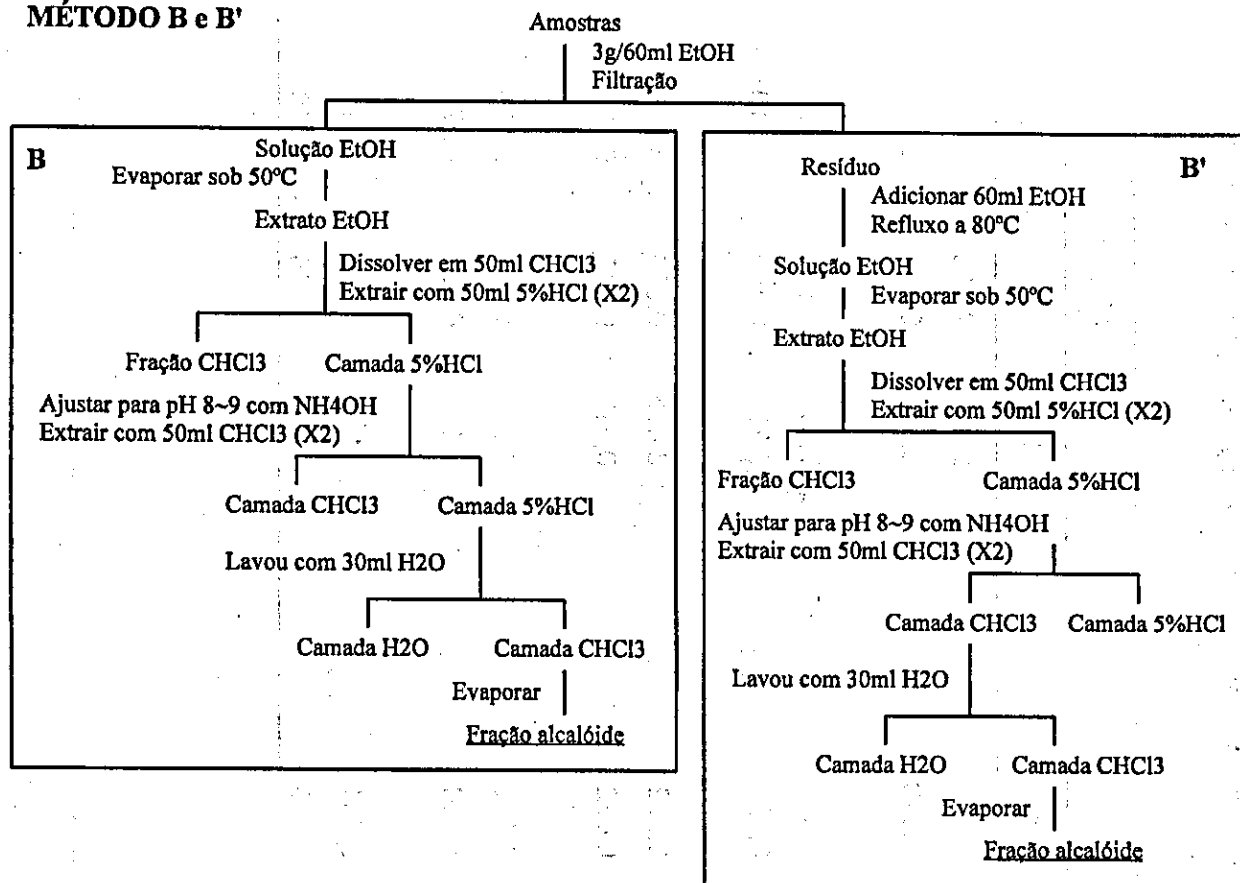
Foram iniciadas as análises para determinação de pilocarpina em duas amostras secas de jaborandi - L₁N₁ e L₂N₂, separadas em caule e folhas, trituradas em moinho de facas e divididas em duas partes. Cada parte foi submetida a extrações diferenciadas (contínua e descontínua), usando metanol como solvente, para eleger o melhor método de processamento. As soluções metanólicas foram concentradas em evaporador rotativo até à secura, pesadas e submetida a uma seqüência de operações específicas para o isolamento de alcalóides. Uma parte do extrato alcalóidico foi utilizada para o isolamento e purificação da pilocarpina, quando então foram discutidos os métodos cromatográficos.

Com os resultados obtidos ficou estabelecido que a pilocarpina encontrava-se exclusivamente nas folhas do vegetal, podendo-se, portanto, descartar o caule. Utilizando-se a técnica de cromatografia em coluna de sílica gel isolou-se certa quantidade de alcalóide com grau de pureza superior a 95%, porém este método foi muito demorado e oneroso.

A pilocarpina de cinco amostras de jaborandi, enumeradas, segundo o local de procedência, de 1 a 5 (1 - Lado esquerdo do cano C.C.M.; 2 - Fazenda Água Azul, folha; 3 - Novo Breu Branco, Sítio do Japonês; 4 - Fazenda Maísa; e 5 - Sítio do Sr. Wilson Açaizal 62, margem do rio Caiari) foi extraída de acordo com os métodos B - C', (Fig. 100), e analisada por HPLC, (Tabela 68). A extração pelos métodos C, C' foi pelo menos três vezes mais eficiente que os métodos B, B'. Essas metodologias não demonstraram boa eficiência na extração de pilocarpina, e não devem ser recomendadas para análise de rotina, por causa dos complicados procedimentos.

Na tentativa de se obter nova metodologia, com solução tampão de fosfato, foi utilizada a amostra 5. Foram pesadas amostras, em triplicata, que variaram de 10mg a 60mg, adicionado 5ml da solução de fosfato, e agitado de cinco a 20 minutos (Tabela 69), filtrado em membrana de 0,45 µm e injetado 10µl em HPLC para determinação de percentual de pilocarpina (Tabela 70). A análise estatística desses dados é mostrada na Tabela 71.

MÉTODO B e B'



MÉTODO C e C'

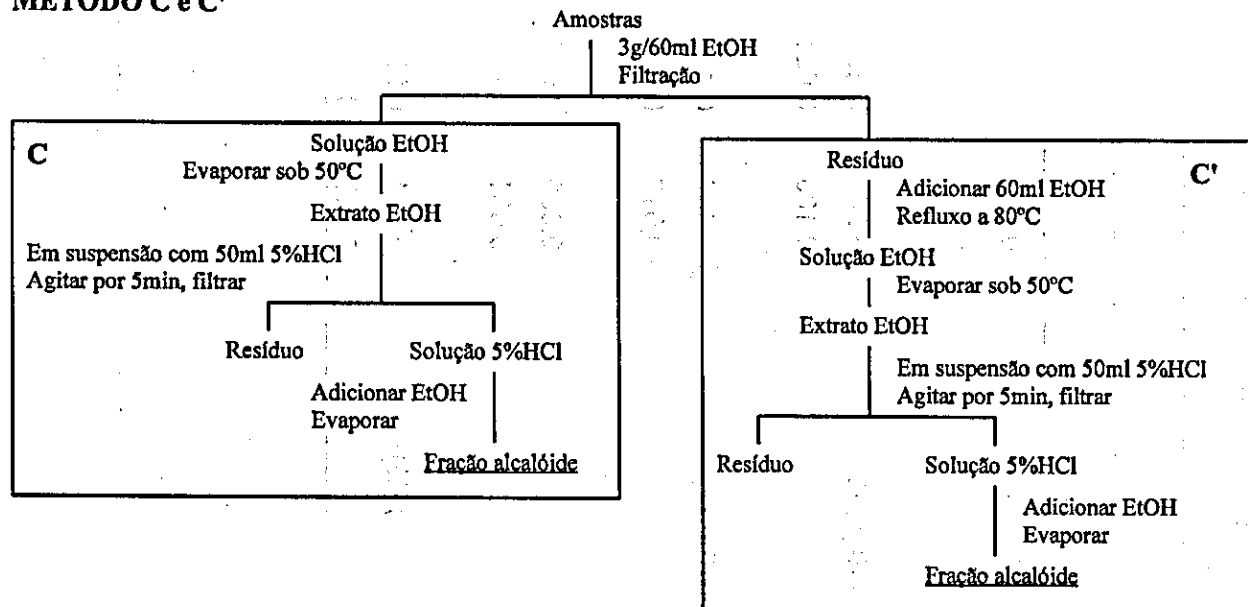


FIG. 100 - Métodos de extração de pilocarpina de jaborandi.

TABELA 68 - Percentagem de pilocarpina em cinco amostras de jaborandi, correspondentes às procedências de 1 a 5.

Nº de amostra	Método			Método		
	B	B'	Total	C	C'	Total
1 - ($\mu\text{g}/10 \mu\text{l}$) (%)	0,305 0,010	0,002 -	0,307 0,010	2,844 0,095	2,138 0,071	4,982 0,166
2 - ($\mu\text{g}/10 \mu\text{l}$) (%)	3,248 0,108	0,636 0,021	3,884 0,129	7,913 0,260	4,538 0,150	12,451 0,410
3 - ($\mu\text{g}/10 \mu\text{l}$) (%)	0,492 0,016	0,480 0,016	0,972 0,032	3,478 0,016	0,386 0,013	3,864 0,129
4 - ($\mu\text{g}/10 \mu\text{l}$) (%)	0,030 0,001	0,002 -	0,032 0,001	4,314 0,144	1,021 0,034	5,335 0,178
5 - ($\mu\text{g}/10 \mu\text{l}$) (%)	5,541 0,185	0,020 0,001	5,561 0,186	11,858 0,395	1,954 0,065	13,812 0,460

TABELA 69 - Diferentes pesos de jaborandi, em mg, das procedências de 1 a 5, e os tempos de agitação para determinar as melhores condições de extração da poliacarpina.

Massa (mg)	Tempo de agitação (min)	⊙	⊗	⊗
10	5	10,5	10,2	10,6
	7,5	10,6	10,3	10,1
	10	10,3	10,9	10,5
	15	10,1	10,1	10,1
	20	10,1	10,2	10,1
20	5	20,3	20,2	20,2
	7,5	20,3	20,2	20,2
	10	20,2	20,1	20,0
	15	20,1	20,4	20,3
	20	20,7	20,8	20,4
30	5	30,2	30,1	30,2
	7,5	30,2	30,3	30,1
	10	30,0	30,3	30,0
	15	30,2	30,1	30,3
	20	30,3	30,4	30,1
40	5	40,6	40,0	40,0
	7,5	40,4	40,0	40,3
	10	40,2	40,2	40,2
	15	40,2	40,0	40,2
	20	40,0	40,2	40,0
50	5	50,4	50,2	50,2
	7,5	50,2	50,2	50,0
	10	50,4	50,0	50,1
	15	50,2	50,0	50,6
	20	50,8	50,8	50,3
60	5	60,3	60,1	60,0
	7,5	60,7	60,2	60,0
	10	60,2	60,7	60,8
	15	60,3	60,2	60,5
	20	60,4	60,4	60,1

min = minutos; ⊙, ⊗, ⊗ = peso em mg de amostras de jaborandi.

TABELA 70 - Percentagem de pilocarpina em jaborandi, em cinco amostras correspondentes às procedências de 1 a 5, em diferentes condições de extração.

Massa (mg)	Tempo de agitação (min)	①	②	③	Média
10	5	0.880	0.918	0.898	0.899
	7.5	0.908	0.876	0.857	0.880
	10	0.963	0.950	0.930	0.948
	15	0.896	0.841	0.871	0.869
	20	0.938	0.930	0.914	0.927
20	5	0.965	0.964	0.964	0.964
	7.5	1.038	0.966	0.987	0.997
	10	1.005	1.046	0.995	1.015
	15	0.934	0.915	0.928	0.926
	20	0.891	0.908	0.905	0.901
30	5	0.960	0.966	0.950	0.959
	7.5	0.952	0.968	0.958	0.959
	10	1.014	0.999	0.994	1.002
	15	1.038	1.026	1.025	1.030
	20	0.931	0.936	0.944	0.937
40	5	0.905	0.901	0.945	0.917
	7.5	0.953	0.927	0.969	0.950
	10	0.937	0.959	0.931	0.942
	15	0.976	0.948	0.937	0.954
	20	0.936	0.979	0.982	0.966
50	5	1.010	1.027	1.064	1.034
	7.5	1.048	1.024	0.993	1.022
	10	1.056	1.113	1.106	1.092
	15	1.004	1.040	0.968	1.004
	20	0.989	1.003	1.028	1.006
60	5	0.984	0.989	0.977	0.983
	7.5	0.979	0.964	0.972	0.972
	10	1.009	1.025	1.014	1.016
	15	0.984	0.984	1.007	0.992
	20	0.997	1.029	0.959	0.995

min = minuto; ①, ②, ③ = repetição de cada amostra.

TABELA 71 - Análise estatística dos resultados da determinação de pilocarpina em amostras de jaborandi.

Descrição das variáveis e fatores do modelo							
Fatores	# Níveis	Níveis					
pa	6	10	20	30	40	50	60
ta	5	5	7.5	10	15	20	

pa = peso da amostra; ta = tempo de agitação; pp = percentagem de pilocarpina.

Variável dependente:

pp

Número de observações lidas:

90

Número de observações utilizadas:

90

Média:

0,96858889

Raiz Quadrada Qmres.:

0,02072599

Coefficiente de Variação:

2,13981291

Comparação de médias para pesos de amostras ^a

pa	n	pp	grupo
50	15	1.031533	a
60	15	0.991533	b
30	15	0.977400	b c
20	15	0.960733	c d
40	15	0.945667	d
10	15	0.904667	e

pa = peso da amostra; n = número de repetições; pp = percentagem de pilocarpina.

Teste "Tukey" para a variável: "pp."

g.l = 60

qme = 0.0004

alfa = 0.05

Médias ligadas com uma mesma letra não são significativamente diferentes.

Comparação de médias para pesos de amostras ^b

ta	n	pp	grupo
10	18	1.002556	a
7.5	18	0.963278	b
15	18	0.962333	b
5	18	0.959278	b
20	18	0.955500	b

ta = tempo de agitação; n = número de repetições; pp = percentagem de pilocarpina.

Teste "Tukey" para a variável: "pp."

g.l = 60

qme = 0.0004

alfa = 0.05

Médias ligadas com uma mesma letra não são significativamente diferentes.

Pode-se concluir que as melhores condições de extração são 50 mg de peso e dez minutos de agitação, segundo as seguintes bases:

Condições do HPLC.

Instrumento: Shimadzu LC - 9 A system

SPD - 6AV (UV - VIS detector)

SCL - 6B (system controller)

C - R 4 A (Chromatopac)

Coluna: PEGASIL ODS 4,6mm ϕ x 150mm

Fase móvel: Dissolver 50 g de fosfato monobásico de potássio (KH_2PO_4) em 900 ml de água e 30 ml de metanol. Ajustar o pH da solução para 2,5 com ácido fosfórico (H_3PO_4) 85%, completar o volume para 1.000ml com água.

Vazão: 1,5ml/minuto.

Temperatura da coluna: 40°C

Comprimento de onda: 216 nm

Análise quantitativa por HPLC

A partir da pilocarpina clorídrica ($C_{11}H_{16}N_2O_2 \cdot HCl$ MW = 244,7) da Wako Pure Chemical Industries, LTD, foi preparada a curva de calibração de soluções padrão contendo 1,469; 0,748; 0,374 µg de pilocarpina/10µl de metanol.

Para confirmar a eficácia da metodologia, foram feitos três experimentos no sentido de recuperar a pilocarpina.

No primeiro experimento foi escolhido o picão, *Bidens pilosa* L., Compositae, por não conter pilocarpina + solução fosfato. O segundo foi constituído de picão + solução fosfato + pilocarpina (50,3 µg/10µl). Do terceiro constou apenas a solução fosfato + pilocarpina. O percentual de recuperação pode ser considerado bom, com 97,8% e 99,2% para o segundo e o terceiro experimentos, respectivamente.

As quatro primeiras amostras (Tabela 67) foram analisadas pela nova metodologia, conforme resultados apresentados na Tabela 72. Analisando-se os dados da Tabela 69 com os da Tabela 71, conclui-se que a metodologia usada na solução de fosfato como extrator é mais eficiente.

TABELA 72 - Percentagem de pilocarpina em quatro amostras de jaborandi.

Amostra	①	②	③	Média
Local 3, lado esquerdo do cano C. C. M.	0.285	0.291	0.277	0.284
Fazenda Água Azul Folha	0.572	0.591	0.562	0.575
Novo Breu Branco Sítio Japonês	0.321	0.336	0.311	0.323
Fazenda Maisa	0.301	0.290	0.299	0.297

Experimento 3 - Estudos agronômicos e fisiológicos de plantas medicinais nativas da Amazônia em processo de domesticação

O extrativismo indiscriminado praticado nas regiões de ocorrência natural de plantas medicinais (e inseticidas) de interesse econômico, aliado ao acelerado desmatamento da Amazônia, sugere uma rápida ação de pesquisadores, visando ao estabelecimento de estudos que propiciem a domesticação dessas espécies e a conseqüente participação das mesmas no processo produtivo dos agricultores da região. Nesse sentido, a presente ação de pesquisa vem procurando estabelecer, através de estudos agronômicos e fisiológicos, as bases para o cultivo racional da ipeca, jaborandi e da quina.

Os estudos agronômicos e fisiológicos foram iniciados em 1992, com observações preliminares sobre o comportamento de plantas de ipeca quando submetidas a níveis de radiação, irrigação e fertilidade do solo, diferentes daqueles predominantes nas áreas de ocorrência natural.

A pouca disponibilidade de material botânico (dispunha-se apenas do material excedente das coletas de germoplasma) impediu o estabelecimento de ensaios que permitissem análises mais profundas e resultados conclusivos. Assim, foram instalados pequenos canteiros experimentais que possibilitaram apenas testar a hipótese de que é possível o cultivo racional da ipeca em sistemas simples com melhor aproveitamento de raízes, do que no sistema tradicional do sub-bosque.

Foi estabelecida a metodologia para a multiplicação de material botânico, via propagação *in vitro* e por enraizamento de segmentos radiculares. Foram realizadas comparações preliminares entre os teores de alcalóides de plantas mantidas em sub-bosque e plantas cultivadas racionalmente, não tendo sido registradas diferenças relevantes entre os dois casos.

Foram testados também métodos de irrigação para ipeca, revelando-se como mais apropriado o gotejamento planta a planta.

Anatomia foliar

Alguns aspectos da anatomia foliar da ipeca são de extrema importância para subsidiar os estudos fisiológicos previstos no subprojeto, principalmente aqueles ligados ao comportamento estomático e à produtividade primária da mesma. Para tanto, utilizou-se material botânico proveniente do BAG de plantas medicinais do CPATU, cultivadas em sub-bosques, coletando-se folhas de plantas adultas em um mesmo estágio de desenvolvimento. De cada folha foram retiradas pequenas seções de diferentes regiões, com cerca de 0,5cm², que foram usadas na preparação das lâminas

Pode-se observar na Tabela 73 o resultado quantitativo das estruturas avaliadas (média de dez folhas de diferentes plantas) quais sejam: tricomas, cutículas, células epidérmicas, parênquimas paliádico e lacunoso, nas epidermes abaxial e adaxial de ipeca.

As folhas de ipeca no seu habitat natural apresentam características anatômicas comuns às observadas nas plantas ombrófilas, representadas por cutículas pouco espessa, parênquima lacunoso com grandes espaços intercelulares e número de estômatos em média de 90/mm². Os valores observados estão de acordo com os apresentados por Voltan, et al. (1992), que estudaram as características anatômicas do cafeeiro (família Rubiaceae como a ipeca), submetidos a diferentes níveis de radiação, constataram que as maiores densidades estomáticas ocorriam em plantas mais sombreadas.

Registrou-se também, a presença de células piriformes entre os parênquimas paliádico e lacunoso, que invadem a nervura central. O feixe vascular do mesófilo é circundado por uma bainha parenquimática sem conteúdo. Os feixes vasculares central e colateral apresentam no ápice e no meio das folhas, a forma de arco, enquanto que na base, apresentam as extremidades curvando-se para o centro.

A densidade estomática de plantas de ipeca a pleno sol e sob sombrite, com retenção de luz de 50 e 70 %, estão contidas na Tabela 74, onde estão expressas, também, as densidades de tricomas observadas em diferentes partes das folhas.

TABELA 73 - Valores médios dos constituintes da estrutura anatômica de folhas de Ipeca.

Identificação	CTEp S (μm)	CTEp I (μm)	ECEp S (μm)	ECEp I (μm)	Eep S (μm)	Eep I (μm)	EPP (μm)	EPL (μm)
Ápice	130,9	128,0	0,60	0,52	30,7	35,4	31,9	91,0
Base	54,6	67,4	1,51	0,36	33,6	32,5	35,4	110,0
Margem	59,9	110,6	0,24	0,37	24,0	27,8	32,5	95,8
Meio	75,5	98,8	0,68	0,22	35,4	34,9	37,2	132,0

CTEp = Comprimento do trícoma da epiderme; ECEp = espessura da cutícula da epiderme; Eep = Espessura da epiderme; EPP = Espessura do parenquima paliádico; EPL = Espessura do parenquima Lacunoso; I = inferior; S = superior.

TABELA 74 - Densidade estomática e de tricomas em folhas de ipeca, sob diferentes níveis de sombreamento.

Tratamento	Estômato				Tricoma			
	AP	BA	MA	ME	AP	BA	MA	INT
Pleno sol	88,4	77,9	83,1	41,0	44,2	41,0	64,2	24,2
Sombrite 50%	93,7	67,4	94,7	115,8	57,9	43,1	64,2	58,9
Sombrite 70%	90,5	92,6	78,9	81,0	69,5	62,5	37,9	47,4

AP = ápice; BA = base; MA = margem; ME = meio; INT = intermediário.

A variação na densidade estomática ao longo da folha é influenciada pelo nível do sombreamento, o mesmo ocorrendo com a presença de tricomas. Todavia, percebeu-se uma clara tendência das maiores densidades ocorrentes nas plantas sombreadas, variando a posição geográfica de acordo com o nível de sombreamento. A consolidação dessas informações favorecerá os estudos de porometria que serão conduzidos nos ensaios de campo.

Enquanto os ensaios de campo estão sendo preparados, procurou-se avaliar o efeito de diferentes níveis de radiação sobre o teor de emetina em plantas jovens de ipeca.

Foram colocadas por doze dias sob sombrite, com 50% e 70% de retenção de luz, e a pleno sol (cinco plantas em cada situação), quinze plantas, cultivadas durante três meses sob condições de sombreamento pleno.

O monitoramento da radiação fotossinteticamente ativa foi realizado com um Ceptômetro da Li-Cor, registrando-se os valores de acordo com a Tabela 75.

O resultado da análise dos teores de emetina nos tecidos radiculares estão expressos na Tabela 76.

TABELA 75 - Radiação fotossinteticamente ativa em diferentes horas do dia, e diferentes condições de cultivo.

Radiação fotossinteticamente ativa ($\mu\text{mol.cm}^{-2}.\text{s}^{-1}$)			
Condição	09:00 h	12:00 h	15:00h
Pleno sol	890	1250	690
Sombrite 50%	470	715	356
Sombrite 70%	217	325	128

TABELA 76 - Teores de emetina em raízes de plantas de ipeca sombreadas e a pleno sol.

Condição	Massa (mg)	Concentração (mg/ml)	(%)	Média
Pleno sol (1)	20,8	0,3476	0,8376	0,8130
Pleno sol (2)	20,4	0,3225	0,7904	
Sombrite 50% (1)	20,3	0,3167	0,7800	0,7533
Sombrite 50% (2)	20,2	0,2935	0,7265	
Sombrite 70% (1)	20,6	0,3644	0,8845	0,8904
Sombrite 70% (2)	20,9	0,3747	0,8964	

Os baixos teores de emetina registrados estão, provavelmente, relacionados com a idade das plantas (muito jovem), todavia as diferenças de concentração não evidenciaram o efeito dos diferentes níveis de radiação sobre a síntese do alcalóide.

Por se tratar de estudo preliminar, os resultados são úteis no sentido do exercício da metodologia, bem como proporcionam indicações concretas para o prosseguimento dos estudos sobre os efeitos da radiação na síntese dos alcalóides.

Com relação ao jaborandi, à semelhança do que aconteceu com a ipeca, foram observados, em ensaios preliminares, os efeitos de três diferentes níveis de radiação sobre o crescimento de mudas enviveiradas.

A despeito da pouca quantidade de plantas em observação, pode-se verificar melhor performance nas plantas submetidas a níveis intermediários de sombreamento (50% em relação a radiação externa).

Foram também iniciados os estudos de anatomia foliar que darão suporte aos estudos ecofisiológicos envolvendo, principalmente, as respostas a níveis diferentes de radiação e nutrição mineral, e seus reflexos sobre a síntese dos princípios ativos, utilizando-se a técnica de Gemaque et al. (1994).

A dissociação da epiderme de folhas de jaborandi cultivadas na sombra (radiação $>100 \mu\text{E} \times \text{cm}^{-2} \times \text{s}^{-1}$) ocorreu em menor tempo do que aquelas crescidas a pleno sol (radiação entre 500 a $1.200 \mu\text{E} \times \text{cm}^{-2} \times \text{s}^{-1}$) (Tabela 77).

A epiderme da face adaxial das folhas sombreadas exibiu células irregulares de paredes lisas e espessas. Na nervura central as células são alongadas, de paredes retas, lisas e espessas.

Na epiderme abaxial das folhas de sombra, as células mostraram-se irregulares, com paredes retas e espessas, com estômatos anomocíticos circundados por 5-7 células epidérmicas

No corte transversal, as folhas de sombra de jaborandi apresentaram cutícula espessa e estriada. O parênquima paliádico é constituído por uma fileira de células alongadas. No mesófilo destacam-se grandes glândulas esquizolizigenas, produtoras de óleo essencial, principalmente perto da epiderme superior, conforme descrito por Metcalfe (1950). O parênquima lacunoso é frouxo e apresenta numerosas drusas de oxalato de cálcio, o que também ocorre no parênquima paliádico. Os feixes vasculares apresentaram-se concêntricos, com fíbrios bastante espessos, especialmente na parte da nervura central.

Nas plantas de jaborandi submetidas à radiação mais intensa, observaram-se muitas similaridades anatômicas com as plantas sombreadas. As células da epiderme adaxial apresentaram-se irregulares, de paredes anticlinais lisas e espessas, com tricomas clariformes pluricelulares. Na nervura central, as células epidérmicas são alongadas de paredes retas, lisas e espessas, sendo que nessa área é que se concentram os tricomas.

O corte transversal mostrou como diferença das plantas de sombra, apenas o parênquima lacunoso, que apresenta menos espaços intercelulares do que aquelas submetidas à maior radiação.

TABELA 77 - Densidade estomática e de tricomas, quantificadas em diferentes partes das folhas de jaborandi.

Tratamento	Estômatos						Tricomas					
	Abaxial			Adaxial			Abaxial			Adaxial		
	AP	ME	BA	AP	ME	BA	AP	ME	BA	AP	ME	BA
Pleno sol	287,3	277,9	281,0	x	x	x	11,58	3,68	6,31	5,26	2,10	2,63
Sombra	x	x	x	211,6	177,9	207,9	x	x	x	x	x	x

AP = ápice; ME = meio; BA = base.

Relações hídricas

O trabalho desenvolvido teve como objetivo analisar a tolerância ao calor e a resistência ao déficit hídrico de ipeca (*Cephaelis ipecacuanha*) e jaborandi (*Pilocarpus macrophyllus*).

Os ensaios começaram a ser realizados em meados de Agosto de 1994. Foram utilizados materiais da coleção de trabalho do CPATU sendo selecionadas plantas jovens e sadias cultivadas sob sombrite. Como parâmetro de avaliação utilizou-se o teor de clorofila a,b e total.

Teste de resistência ao calor

Foram retirados discos foliares medindo 1cm de diâmetro, lavados e, posteriormente dispostos em placas de Petri (12 discos por placa) contendo água destilada. Paralelamente foram tomados quatro grupos similares que após secagem em estufa a 80°C por 24 horas, serviram para avaliação do peso de matéria seca.

Foram construídos três grupos de quatro placas cada, os quais foram submetidos respectivamente às temperaturas de 25,35 e 45°C, durante uma noite em incubador com ventilação forçada após o tratamento. Os conjuntos de discos foliares foram macerados com acetona a 80% e areia (para facilitar a maceração) centrifugados 2500 rpm por 15 min. e a clorofila no sobrenadante foi estimado espectrofotometricamente.

Teste de tolerância ao déficit hídrico

A metodologia básica foi a mesma do ensaio anteriormente descrito, porém os discos foram dispostos sobre uma camada de papel de filtro com solução de polietileno glicol (PEG) 600, nas concentrações de 0, 5, 10, 15, 20, 25% (P/V) e incubados durante uma noite a 30°C.

Em seguida, os discos foram retirados, lavados com água destilada, seguindo-se a extração de clorofila como descrito anteriormente.

A extração de clorofila foi feita segundo ARNON* (1949), avaliando-se a absorvância nos comprimentos de onda: 623, 645, 663 (nm). Os tubos com os extratos, foram protegidos com papel alumínio para evitar a degradação da clorofila.

Os teores de clorofila (mg de clorofila/g de matéria seca) foram calculados usando-se as equações abaixo:

a) mg de *clorofila a* / g de tecido = $[12,7(A_{663}) - 2,69(A_{645})] \times V / (1000 \times W)$

b) mg de *clorofila b* / g de tecido = $[22,9(A_{645}) - 4,68(A_{663})] \times V / (1000 \times W)$

c) mg de *clorofila total* / g de tecido = $[20,2(A_{645}) - 8,02(A_{663})] \times V / (1000 \times W)$

Para o teste de déficit hídrico, foi utilizado polietileno glicol (PEG 600) nas concentrações: 5, 10, 15, 20, 25% (P/V). Os potenciais osmóticos das soluções de PEG usadas foram medidos em um osmômetro Wescor modelo 1500 CXR, calibrado segundo uma curva padrão de NaCl a várias concentrações molais

* ARNON, D.I. - Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. Plant Physiol. 24(1):1-15, 1949.

Os resultados mostraram que existem diferenças nos teores de clorofila das espécies estudadas, quando submetidas a diferentes temperaturas e concentrações de polietileno glicol (PEG), como pode ser observado nas tabelas abaixo.

Teste de resistência ao déficit hídrico

Ipeca

Concentração de PEG (%)	Clorofila ^a (mg/g MS)	Clorofila ^b (mg/g MS)	Clorofila Total (mg/g MS)
0.0	8.07	3.87	10.68
5.0	7.10	2.70	8.86
10.0	7.33	3.01	9.16
15.0	7.93	3.60	10.31
20.0	8.20	4.17	11.14
25.0	7.56	3.27	9.62

PEG = Polietileno glicol; MS = matéria seca.

Jaborandi

Concentração de PEG (%)	Clorofila ^a (mg/g MS)	Clorofila ^b (mg/g MS)	Clorofila Total (mg/g MS)
0.0	2.67	0.82	3.14
5.0	2.95	1.10	3.56
10.0	3.04	0.87	3.65
15.0	2.60	0.85	3.03
20.0	2.44	0.76	2.88
25.0	2.24	0.65	2.65

PEG = Polietileno glicol; MS = matéria seca.

Teste de resistência ao calor

Ipeca (clorofila^a)

TRAT(°C)	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	MÉDIA	Sd	CV (%)
25	13.682	13.770	16.915	16.525	15.223	1.736	11.41
35	15.966	17.281	13.188	15.834	15.567	1.715	11.02
45	16.228	15.825	12.088	13.533	14.419	1.955	13.56

R = Repetição; Sd = desvio padrão; CV = Coeficiente de variação.

Ipeca (clorofila^b)

TRAT(°C)	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	MÉDIA	Sd	CV (%)
25	0.587	0.576	0.866	0.798	0.707	0.147	20.85
35	0.744	0.875	0.585	0.728	0.733	0.119	16.18
45	0.808	0.731	0.498	0.658	0.674	0.132	19.62

R = Repetição; Sd = desvio padrão; CV = Coeficiente de variação.

Ipeca (clorofila total)

TRAT(°C)	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	MÉDIA	Sd	CV (%)
25	17.422	17.375	23.021	21.988	19.952	2.978	14.93
35	20.959	23.426	16.526	20.682	20.398	2.861	14.03
45	21.849	20.704	15.163	18.055	18.943	2.979	15.73

R = Repetição; Sd = desvio padrão; CV = Coeficiente de variação.

Jaborandi (clorofila^a)

TRAT(°C)	RI	RII	RIII	RIV	MÉDIA	Sd	CV (%)
25	4.001	3.809	3.614	3.830	3.814	0.158	4.15
35	3.995	3.961	3.860	3.552	3.842	0.202	5.25
45	3.820	3.321	3.084	3.429	3.414	0.307	8.99

R = Repetição; Sd = desvio padrão; CV = Coeficiente de variação.

Jaborandi (clorofila^b)

TRAT(°C)	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	MÉDIA	Sd	CV (%)
25	0.177	0.161	0.135	0.156	0.157	0.017	11.02
35	0.182	0.177	0.161	0.132	0.163	0.023	13.82
45	0.162	0.122	0.113	0.132	0.132	0.021	16.10

R = Repetição; Sd = desvio padrão; CV = Coeficiente de variação.

Jaborandi (clorofila total)

TRAT(°C)	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	MÉDIA	Sd	CV (%)
25	5.162	4.832	4.397	4.795	4.797	0.313	6.53
35	5.210	5.131	4.872	4.314	4.882	0.405	8.30
45	4.846	4.016	3.732	4.208	4.201	0.473	11.25

R = Repetição; Sd = desvio padrão; CV = Coeficiente de variação.

A exposição dos tecidos foliares das duas espécies à temperatura entre 35 e 45 °C provoca degradação principalmente da clorofila total.

O déficit hídrico isoladamente causou menor degradação das clorofilas nas duas espécies. É possível que esse efeito possa ser potencializado, se combinado com altas temperaturas, como ocorre de fato nas condições de campo.

Caracterização de sintomas de deficiência e nutrição mineral

Os estudos de caracterização de sintomas de deficiência mineral em plantas de jaborandi foram desenvolvidos em casa-de-vegetação, utilizando-se mudas crescidas em vasos plásticos, tendo como substrato quartzo moído e nutridas com solução de Bulle - Jones completa e com exclusão dos macro e micronutrientes.

Os resultados mostraram os sintomas característicos das deficiências de macro e micronutrientes em plantas jovens de jaborandi, devendo os mesmos serem objeto de publicação específica.

A ação de pesquisa "Efeito de doses de NPK em mudas de jaborandi" teve início em fevereiro de 1995, tendo sido utilizadas mudas provenientes de propagação sexuada, com cerca de cinco meses de idade.

Como fonte de nutrientes foram empregados superfosfato simples, cloreto de potássio e uréia. O fósforo foi aplicado de uma única vez, na implantação do experimento, enquanto que as doses de nitrogênio e potássio foram parceladas em três aplicações, sendo a primeira juntamente com o fósforo e as restantes em intervalos de 45 dias. Os adubos foram aplicados em cobertura, pelo fato das mudas se encontrarem plantadas nos sacos, na ocasião da implantação do experimento. A primeira avaliação das variáveis - altura das plantas e contagem do número de folhas - foi realizada 30 dias após a implantação do experimento.

Deu-se prioridade ao aumento do estoque de material botânico e ao estabelecimento das coleções de trabalho que possam apoiar os experimentos de nutrição mineral e manejo de plantas, tanto que dispõem-se de mais ou menos 300 mudas de jaborandi enviveiradas.

Conclusões preliminares

As coletas de ipeca cobriram as principais áreas de ocorrência natural da espécie, resultando numa significativa amostragem que representa a sua dispersão na amazônia brasileira.

As coletas de jaborandi foram prejudicadas pela indisponibilidade de recursos financeiros nas melhores épocas de produção de sementes, resultando na formação de um BAG contendo apenas a espécie *Pilocarpus microphyllus* Stapf.

Os melhores resultados de propagação da ipeca foram obtidos de forma assexuada, através do enraizamento de segmentos de rizomas ou caulículos subterrâneos. No caso do jaborandi, a propagação sexuada foi a forma mais eficiente.

Os estudos agronômicos e fisiológicos estão em andamento, tendo-se obtido resultados preliminares básicos quanto à anatomia foliar comparada das espécies, comportamento estomático de plantas em diferentes níveis de radiação e exigências nutricionais de plantas jovens de ipeca e jaborandi.

Foram estabelecidas as coleções de trabalho de ipeca e jaborandi, que proporcionarão a disponibilidade de material botânico para o prosseguimento dos estudos agronômicos e fisiológicos.

Difusão de tecnologia

Os resultados da pesquisa foram divulgados através de cursos, palestras, seminários, painéis, informações à imprensa televisionada e escrita, visitas ao campo experimental, laboratórios e casas-de-vegetação, além de publicação de resultados preliminares em anais de congressos e revistas especializadas.

ANEXOS

ANEXO I

Relação dos documentos gerados no Convênio de Cooperação Técnica entre o CPATU e a JICA

- ALBUQUERQUE, F.C. de. Apostila para treinamento dos técnicos da República Dominicana.
- ALBUQUERQUE, F.C. de.; STEIN, R.L.B.; NUNES, A.M.L. Utilização de *Piper colubrinum* como porta-enxerto para a conservação de germoplasma de pimenta-do-reino em áreas de ocorrência de doenças. **Fitopatologia brasileira**, 18 (suplemento). p.297, 1993.
- ALBUQUERQUE, F.C. de.; HAMADA, M.; DUARTE, M.L.R. Espécies de *Piper* nativas da Amazônia brasileira, hospedeiras de *Nectria haematococca* f.sp. *piperis*. **Fitopatologia brasileira**, 20 (suplemento). p. 353, 1995.
- CASTRO, C.B.; MARTINS, C. da S.; FALES, I.C.; NAZARÉ, R.F.R. de.; KATO, O.R.; STEIN, R.L.B.; MAUÉS-VENTURIERI, M. A cultura do urucum / Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Centro de Pesquisa Agroflorestal da Amazônia Oriental - Brasília: EMBRAPA - SPI, 1994. 61 p. (Coleção plantar).
- COSTA, M.P. da; LAMEIRA, O.A. Micropropagação "in vitro" de bacuri (*Platonia insignis*, Mart). In: SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UFPa, III, 1992, Belém. **Anais ...**, p.53.
- COSTA, M.P. da; LAMEIRA, O.A. Micropropagação "in vitro" de ipeca (*Cephaelis ipecacuanha*, A. Richard). In: SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UFPa, III, 1992, Belém. **Anais ...**, p.54.
- COSTA, M.P. da; LAMEIRA, O.A.; PINTO, J.E.B.P.; SATO, A.Y.; DECHAMPS, C.; INNECCO, R.; RODRIGUES, B.M.; CARVALHO, D.G. Efeito dos reguladores de crescimento na formação de plantas de *Cephaelis ipecacuanha* A. Richard por cultura de tecidos. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, São Carlos, v.5, n.1, p.108, 1993.
- EMBRAPA QUER PRESERVAR POLINIZADORES, artigo do jornal A Folha de São Paulo, caderno Agrofolha, 09.02.93, São Paulo, SP, 1993.
- GEMAQUE, R.C.; CARDOSO, M.R.; BOTELHO, M.N.; SANTIAGO, E.J.A.; ROCHA NETO, O.G. da. Estudos anatômicos e fisiológicos do jaborandi (*Pilocarpus microphyllus* Stapf). In: IV SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA FCAP-CNPq/IPIBIC, 1994, Belém.
- GUIMARÃES, A.D.G.; MOTA, M.G. da C.; NAZARÉ, R.F.R. de. Coleta de germoplasma de bacuri (*Platonia insignis*, Mart), na Amazônia I. Microrregião Campos do Marajó (Soure/Salvaterra). Belém, EMBRAPA-CPATU. 1992. 23p. (EMBRAPA-CPATU. Boletim de Pesquisa, 132).
- KUSUHARA, K. Corantes naturais utilizados em alimentos no Japão. In: II CONGRESSO BRASILEIRO DE CORANTES NATURAIS E II SIMPÓSIO BRASILEIRO DE URUCU. Belém, 19-22 set., 1994.
- LAMEIRA, O. A.; LEMOS, O. F. de; RODRIGUES, I. A.; COSTA, M. P. da. Produção de calos "in vitro" de *Cephaelis ipecacuanha* A. Richard. Belém, EMBRAPA - CPATU. 2p. (EMBRAPA - CPATU. Comunicado Técnico, 66)

- LAMEIRA, O. A.; LEMOS, O. F. de; MOTA, M. G. da C.; COSTA, M. P. da. Propagação "In vitro" do bacurizeiro (*Platonia insignis*, Mart) e de castanheira (*Bertholletia excelsa* H.B.K.). Belém, EMBRAPA - CPATU, 1992. 2p. (EMBRAPA - CPATU. Pesquisa em Andamento, 160).
- LAMEIRA, O. A. Recomendações básicas para condução de trabalhos no Laboratório de Cultura de Tecidos. 4p. 1992. Apostila.
- LAMEIRA, O. A.; COSTA, M. P. da. Clonal propagation of *Cephaelis ipecacuanha* A. Richard by in vitro culture. *Plant Science*. 1993 (Resub. JAS-1989). (no prelo).
- LAMEIRA, O.A., GOMES, M. R. de O.; NETO, O. G. da R.; SANTIAGO, E. J. A. de; RODRIGUES, I. A. Efeito de anxinás sobre o enraizamento de estacas de raiz de *Cephaelis ipecacuanha* A. Richard. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, São Carlos, v.5, n.1, p.81, 1993.
- LAMEIRA, O.A.; COSTA, M. P. da; PINTO, J.E.B.P & SANTIAGO, E. J. A. Propagação clonal "in vitro" de *Cephaelis ipecacuanha* A. Richard, através de segmentos intermodais. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, São Carlos, v.5, n.11, p.100, 1993.
- LAMEIRA, O.A.; LEMOS, O. F. de.; MOTA, M. G. da C.; MENEZES, I. C. de. Protocolo para propagação de pimenta-do-reino através de ápice caulinar. *ABCTP - Notícias*, n.18, p.11, 1992.
- LAMEIRA, O. A.; COSTA, M. P. da; PINTO, J.E.B.P. Effect of Growth regulators on plantlet formation of *Cephaelis ipecacuanha* A. Richard by tissue culture. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 1993 (Resub. 001/93-T.). (no prelo).
- LAMEIRA, O. A.; GOMES, M. R. de O.; NETO, O.G. da R.; SANTIAGO, E. J. A. de; RODRIGUES, I. A. Propagation of *Cephaelis ipecacuanha* A. Richard by root cuttings. *Plant Science*. 1993 (Resub. JAS-1926). (no prelo).
- LAMEIRA, O. A.; COSTA, M.P. da; SANTIAGO, E.J.A. de. Propagação clonal de *Cephaelis ipecacuanha* A. Richard através da cultura de tecidos. In: XLIV CONGRESSO BRASILEIRO DE BOTÂNICA. 1993, São Luis-MA.
- LAMEIRA, O. A.; COSTA, M.P. da.; TOLEDO, M.L.B. de; SANTIAGO, E.J.A. de. Propagação de plantas medicinais através de técnicas "in vitro". In: XLIV CONGRESSO BRASILEIRO DE BOTÂNICA. 1993, São Luis-MA.
- LEMOS, O. F. de.; LAMEIRA, O.A.; NASCIMENTO, Z.M.B. do.; MENEZES, I.C. de.; MOTA, M.G. da C.; SANTIAGO, E.J.A. de. Embriogênese somática de urucu. In: XLIV CONGRESSO BRASILEIRO DE BOTÂNICA. 1993, São Luis-MA.
- LEMOS, O. F. de.; MENEZES, I.C. de; LAMEIRA, O.A.; MOTA, M.G. da C.; SANTIAGO, E.J.A. de. Propagação de pimenta-do-reino através da cultura de ápice caulinar. In: XLIV CONGRESSO BRASILEIRO DE BOTÂNICA. 1993, São Luis-MA.
- LEMOS, O. F. de.; MENEZES, I.C. de.; Regeneração in vitro de Plantas de Pimenta-do-reino (*Piper nigrum* L.) a partir de calos. In: Anais V CONGRESSO BRASILEIRO DE FISILOGIA VEGETAL. 1995, Lavras-MG.
- MARTINS, C. da S.; MOTA, M.G. da C.; NAZARÉ, R. F. R. de; CASTRO, C. B. de. Avaliação de progênies de urucu no nordeste paraense. In: I SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE URUCU E CORANTES NATURAIS. 1991, Campinas - SP.

- MARTINS, C. da S.; MOTA, M.G. da C.; CASTRO, C. B. de; NAZARÉ, R. F. R.de. Coleta e conservação de germoplasma de urucu (*Bixa orellana*, L.). In: I SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE URUCU E CORANTES NATURAIS. 1991, Campinas - SP.
- MARTINS, C. da S.; SOUZA, F.R.S. de; OLIVEIRA, V.P.; NAZARÉ, R.F.R. de. Ensaio nacional de títulos superiores de urucuzeiro no ecossistema terra firme no Estado do Pará. In: Resumos do II CONGRESSO BRASILEIRO DE CORANTES NATURAIS E II SIMPÓSIO BRASILEIRO DE URUCU. Belém-PA, 19-22 set., 1994, p. 29.
- MARTINS, C. da S.; NAZARÉ, R.F.R. de. Melhoramento genético do urucuzeiro no Estado do Pará. In: Resumos do II CONGRESSO BRASILEIRO DE CORANTES NATURAIS E II SIMPÓSIO BRASILEIRO DE URUCU. Belém-PA, 19-22 set., 1994, p. 35.
- MAUÉS, M.M.; VENTURIERI, G.C.; OLIVEIRA, F.C. - Ecologia da Polinização de Urucuzeiro (*Bixa orellana* L.) em Belém - PA. In: Resumos do II CONGRESSO BRASILEIRO DE CORANTES NATURAIS. II SIMPÓSIO BRASILEIRO DE URUCU. set., 1994, Belém, PA.
- MAUÉS, M.M.; VENTURIERI, G.C. Pollination biology of anatto and its pollinators in Amazon area. *Honeybee Science*, v.16, n.1, p.27-30. Honeybee Science Research Center, Tamagawa University, Tokyo, 1995. (Em japonês traduzido pelo Dr. Jun Nakamura - consultor da JICA).
- MAUÉS-VENTURIERI, M.; VENTURIERI, G.C. Identificação e técnicas de criação de polinizadores de espécies vegetais de importância econômica no Estado do Pará. Belém, EMBRAPA - CPATU. 1991. (EMBRAPA - CPATU, Relatório de Andamento).
- MAUÉS-VENTURIERI, M.; VENTURIERI, G.C. Insetos visitantes e seu comportamento em inflorescências de urucuzeiro (*Bixa orellana*, L.) em Belém - Pará. Belém: EMBRAPA - CPATU, 1992, 3p. (EMBRAPA - CPATU. Pesquisa em Andamento, 154).
- MAUÉS-VENTURIERI, M.; VENTURIERI, G.C. Ecologia da polinização de Urucu (*Bixa orellana*, L.) em Belém - Pará. In: XLIV CONGRESSO NACIONAL DE BOTÂNICA, Jan. 1993. São Luís-MA.
- MAUÉS-VENTURIERI, M.; VENTURIERI, G.C. Aspectos da biologia floral do urucuzeiro (*Bixa orellana*, L.) na região de Belém - Pará. Reunião técnico-científica sobre melhoramento genético de urucuzeiro. 1. 1991, Belém-PA. Anais: EMBRAPA-CPATU, 1992 (EMBRAPA-CPATU, Documentos, 69, p.82-89)
- MELO, C.; HUH, S.; BARBOSA, W.C.; FURLAN JUNIOR, J. Extração e caracterização do óleo e do oleorresina da pimenta-do-reino. In: Workshop sobre Geração de Tecnologia Agroindustrial para o Desenvolvimento do Trópico Úmido. 11-12 abr., 1994. Belém.
- MENEZES, I.C. de; LEMOS, O.F. de; LAMEIRA, O. A. Regeneração em calo de pimenta-do-reino. In: WORKSHOP SOBRE GERAÇÃO DE TECNOLOGIA AGROINDUSTRIAL PARA O DESENVOLVIMENTO DO TRÓPICO ÚMIDO. 11-12 abr., 1994. Belém.
- MENEZES, I.C. de; LEMOS, O.F. de; LAMEIRA, O.A. Micropropagação através do ápice caulinar de pimenta-do-reino. In: WORKSHOP SOBRE GERAÇÃO DE TECNOLOGIA AGROINDUSTRIAL PARA O DESENVOLVIMENTO DO TRÓPICO ÚMIDO. 11-12 abr., 1994. Belém.
- MENEZES, I.C. de; MOTA, M.G. da C.; NUNES, H.B. Regeneração em calo de pimenta-do-reino. In: SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA FACULDADE CIÊNCIAS AGRÁRIAS DO PARÁ. Belém, set., 1994.

- MENEZES, I.C.de; NUNES, H. da C.B.; MOTA, M.G. da C.; Indução de brotação em explante de pimenta-do-reino (*Piper nigrum* L.). In: I ENCONTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO DA FCAP, 1995, Belém-PA. **Anais**.
- MOTA, M.G. da C.; LEMOS, O.F. de; POLTRONIERI, M.C.; MENEZES, I.C. **Melhoramento de plantas de interesse econômico para a região amazônica através de técnicas "In vitro"**. Belém, EMBRAPA-CPATU, 1991, 4p. (EMBRAPA - CPATU. Pesquisa em Andamento, 149).
- NASCIMENTO, Z.M.B. do; LAMEIRA, O.A. Micropropagação do urucu (*Bixa orellana*, L.). In: SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UFPa, III, 1992, Belém. **Anais...** p.49.
- NASCIMENTO, Z.M.B. do; LAMEIRA, O.A. Embriogênese somática a partir de embriões zigóticos de urucu (*Bixa orellana*, L.). In: SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS DO PARÁ. III, 1993, Belém. p.29.
- NAZARÉ, R.F.R. de; KUSUHARA, K.; BARBOSA, W.C.; ALVES, S. de M.; RODRIGUES, I.A. Estudo para identificação de vegetais produtores de corantes, ocorrentes na Flora Amazônica. Sociedade Brasileira de Corantes Naturais. In: II CONGRESSO BRASILEIRO DE CORANTES NATURAIS E II SIMPÓSIO BRASILEIRO DE URUCU. 19-22 set, 1994, Belém-PA.
- NAZARÉ, R.F.R. de. Potencialidade de plantas amazônicas produtoras de corantes naturais. In: Resumos do II CONGRESSO BRASILEIRO DE CORANTES NATURAIS E II SIMPÓSIO BRASILEIRO DE URUCU. 19-22 set, 1994, Belém-PA. p.18.
- NUNES, A.M.L. Curso de fruticultura - doenças do cupuaçu e acerola. 9p. 1993. Apostila.
- NUNES, A.M.L.; ALBUQUERQUE, F.C.; NUNES, M.A.L.; STEIN, R.L.B.; VASCONCELOS, M.A.M. Influência da concentração de basidiosporos de *Crinipellis pernicioso* na infecção de mudas de cupuaçuzeiro (*Theobroma grandiflorum*). **Fitopatologia brasileira** 18 (suplemento) p.323. 1993.
- NUNES, A.M.L.; STEIN, R. L. B.; NUNES, M. A. L.; ALBUQUERQUE, F. C. Avaliação de métodos de inoculação com *Crinipellis pernicioso* em mudas de cupuaçuzeiro. **Relatório Técnico Anual**. EMBRAPA - CPATU, Belém, 1991.
- NUNES, A.M.L.; NUNES, M. A. L.; ALBUQUERQUE, F. C.; STEIN, R. L. B. Curva de progresso da vassoura-de-bruxa do cupuaçuzeiro, em condições de campo. **Relatório Técnico Anual**. EMBRAPA - CPATU, Belém, 1991.
- NUNES, A.M.L.; NUNES, M.A.L.; ALBUQUERQUE, F.C.de; OLIVEIRA, R.P.; VASCONCELOS, M.A.M.; STEIN, R.L.B. Epidemiologia da vassoura-de-bruxa do cupuaçuzeiro (*Theobroma grandiflorum*). **Fitopatologia Brasileira**.
- NUNES, A.M.L.; NUNES, M.A.L.; ALBUQUERQUE, F.C. de; OLIVEIRA, R.P. de; VASCONCELOS, M.A.M. Produção de basidiocarpos de *Crinipellis pernicioso* sobre *Theobroma grandiflorum* em diferentes ambientes. 20 (Suplemento): 355. 1995.
- NUNES, H. da C.B.; MOTA, M.G. da C.; MENEZES, I.C. Indução de calos em explante de pimenta-do-reino (*Piper nigrum*, L.). In: III SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA FCAP/UFPa. 26 abr., 1993 - Belém - Pará. Resumos.

- OLIVEIRA, F.C.; MAUÉS-VENTURIERI, M. Aspectos da biologia reprodutiva de urucu (*Bixa orellana*, L.) em Belém, PA. In: III SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS DO PARÁ, Belém, abril, 1993.
- OLIVEIRA, F.C. de; MAUÉS, M.M. , Levantamento de animais visitantes de flores de bacurizeiro (*Platonia insignis*) em Belém, PA. In: IV SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS DO PARÁ. Belém, PA, setembro, 1994.
- OLIVEIRA, F.C. de; MAUÉS, M.M. Levantamento de animais visitantes de flores de bacurizeiro (*Platonia insignis*). In: Resumos do II CONGRESSO BRASILEIRO DE ECOLOGIA. dez., 1994, Londrina-PR.
- OLIVEIRA, F.C. de; MAUÉS, M.M. Levantamento de animais visitantes de flores de bacurizeiro (*Platonia insignis*). In: Resumos do XIV CONGRESSO BRASILEIRO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS DO PARÁ. dez., 1994, VIÇOSA-MG.
- POTIGUARA, R.V.; ROCHA NETO, O.G.; SANTIAGO, E.J.A.; GEMA, R.C. Contribuição para o estudo de espécies medicinais nativas em processo de domesticação: A Ipecacuanha (*Cephaelis ipecacuanha* (Brot.) A. Rich.). In: I REUNIÃO DE BOTÂNICOS DA AMAZÔNIA, MPEG/CNPq, 1995, Belém-PA.
- ROCHA NETO, O.G.; POTIGUARA, R.V.; SANTIAGO, E.J.A.; ALVES, S.M.; GEMAQUE, R.C. Características anatômicas e respostas ecofisiológicas da Ipeca (*Cephaelis ipecacuanha* (Brot.) A. Rich.) dentro do processo de domesticação da espécie. In: V CONGRESSO BRASILEIRO DE FIOLOGIA VEGETAL, UFLA, Lavras-MG, 1995.
- RODRIGUES, I.A.; MENDES, J.C.; MARQUES, M.E. Estudos sobre enraizamento e propagação de *Cephaelis ipecacuanha* (Brot.) A. Rich. "Ipeca". In V CONGRESSO LATINO AMERICANO DE BOTÂNICA. Havana. 1990.
- RODRIGUES, I.A.; VIEIRA, R.F.; MARQUES, M.E.T.; SILVA, C.S. da. Coleta de germoplasma de *Pilocarpus microphyllus* Stapf, nos Estados do Maranhão e Pará. In: XLIV CONGRESSO NACIONAL DE BOTÂNICA. 1993, São Luis-MA.
- RODRIGUES, I.A.; MOURA, M.G.; GOMES, M.R. Estudo da floração e frutificação de *Cephaelis ipecacuanha* (Brot.) A. Rich. (ipeca), no banco do germoplasma do CPATU/EMBRAPA, Belém-PA; In: XIII SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL. 1994, Fortaleza-CE.
- RODRIGUES, I.A, MOURA, M.G.; MENDES, A.M.C.; FURTADO, A.S.; CARDOSO, M.I. Noções sobre o comércio de plantas de uso medicinal em Belém-PA. In: XIII SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL. 1994, Fortaleza-CE.
- RODRIGUES, I.A.; ROCHA NETO, O.G. et al. Coleta propagação e avaliação de plantas medicinais da Amazônia. In: WORKSHOP SOBRE GERAÇÃO DE TECNOLOGIA AGROINDUSTRIAL PARA O DESENVOLVIMENTO DO TRÓPICO ÚMIDO. Belém, 11-12 abr., 1994.
- RODRIGUES, I.A; SERRA, A.G.P.; MOURA, M.G. Estudos preliminares da floração e frutificação de *Psychotria ipecacuanha* (Brot) Stokes, (ipeca), no banco do germoplasma do CPATU/EMBRAPA, Belém-PA. In I REUNIÃO DOS BOTÂNICOS DO BRASIL, 1995, Belém.

- SANTOS, M.M. de Q.; RODRIGUES, I.A. Plantas medicinais da Amazônia brasileira. In: SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DO MUSEU GOELDI E DA FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS DO PARÁ, III. 1993, Belém.
- SERRA, A.G.P.; RODRIGUES, I.A. Morfologia e biometria da semente de quebra-pedra, *Phyllanthus niruri* L. In: IV SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA FCAP-CNPq/IPIBIC, Belém, 1994.
- SERRA, A.G.P.; RODRIGUES, I.A. Métodos para superação da dormência de sementes de quebra-pedra, *Phyllanthus niruri* L. In: IV SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA FCAP-CNPq/IPIBIC, Belém, 1994.
- STEIN, R.L.B.; NASCIMENTO, R.M. Estudos "in vitro" e "in vivo" de *Crinipellis perniciosa* de *Theobroma* spp. In: SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UFPa, 3, Belém. 6-10, abr., 1992.
- STEIN, R.L.B.; ALBUQUERQUE, F.C.; NUNES, A.M.L. Levantamento de microrganismos potencialmente ativos contra *Fusarium solani* f. sp. *piperis*. Belém, EMBRAPA - CPATU, Relatório de Andamento.
- STEIN, R.L.B.; ALBUQUERQUE, F.C.; NUNES, A.M.L. Comportamento "in vivo" da vassoura-de-bruxa do cupuaçuzeiro. Belém, EMBRAPA - CPATU, 1992, (EMBRAPA - CPATU, Relatório de Andamento).
- STEIN, R.L.B.; ALBUQUERQUE, F.C.; NASCIMENTO, R.M. Biologia de *Crinipellis perniciosa* do cupuaçuzeiro: observações de campo. *Fitopatologia brasileira*. 19 (Suplemento), p.273. 1994.
- TOLEDO, M.L.B. de; LAMEIRA, O. A.; COSTA, M. P. da.; SANTIAGO, E.J.A. de. Micropropagação in vitro do bacurizeiro (*Platonia insignis*, Mart) e da castanheira (*Bertholletia excelsa* H.B.K.). In: XLIV CONGRESSO BRASILEIRO DE BOTÂNICA. 1993, São Luis-MA.
- VENTURIERI, G.C.; MAUÉS-VENTURIERI, M. - Estudos fenológicos em urucuzeiro (*Bixa orellana*, L.) em Belém - PA. Belém: EMBRAPA - CPATU, 1992. 4p. (EMBRAPA - CPATU. Pesquisa em Andamento, 159).
- VENTURIERI, G.C.; MAUÉS-VENTURIERI, M. Notas sobre a biologia reprodutiva de bacuri (*Platonia insignis*, Mart.) em Belém, PA. In: XLIV CONGRESSO NACIONAL DE BOTÂNICA, Jan., 1993, São Luis-MA.
- VENTURIERI, G.C.; MAUÉS, M.M. Biologia e Criação de Abelhas sem Ferrão. Apostila elaborada para o curso do XX Congresso Brasileiro de Zoologia (não publicada).
- YONEYAMA, S.; STEIN, R.L.B.; NUNES, A.M.L. Studies on measuring fusarium foot and root rot on black pepper. 2-Research on antagonistic microorganisms in Amazon region and their activities. Annual Meeting of the Phytopathological Society of Japan, p. 76. April 3-5, 1993. Kinki University, Nara, Japan.
- YONEYAMA, S.; STEIN, R.L.B.; NUNES, A.M.L. Estudos sobre o controle biológico de *Fusarium solani* f.sp. *piperis*. I - Seleção de antagonistas "in vitro". *Fitopatologia brasileira*. 18 (suplemento), p.301. 1993.
- YONEYAMA, S.; STEIN, R.L.B. Studies on measuring Fusarium foot and root rot on black pepper in Amazon region. 1 - Disease ecology. Annual of the Phytopathological Society of Japan, pg. April 3-5, 1993. Kinki University, Nara, Japan.

ANEXO II

Peritos japoneses que prestaram consultoria no CPATU

Curto Prazo:

Dr. Hiroyuri Kamakura	Especialista em Análise Química Período: 02/11/91 a 28/11/91
Dr. Seibi Oka	Especialista em Cultura de Tecido Período: 05/12/90 a 31/01/91
Dr. Takeo Saito	Especialista em Cultura de Tecido Período: 21/11/91 a 16/12/91
Dr. Zenzaburo Abe	Especialista em Fitopatologia Período: 05/09/91 a 16/10/91 Período: 07/02/93 a 29/03/93
Dr. Kenichi Asano	Especialista em Óleo e Oleorresina Período: 04/11/92 a 20/12/92 Período: 07/02/93 a 18/03/93 Período: 16/10/93 a 15/12/93
Dr. Hyroyuri Iketani	Especialista em Análise de Isoenzimas Período: 04/11/92 a 19/12/92
Dr. Osamu Shirota	Especialista em Fitoquímica Período: 07/02/93 a 29/03/93
Dr. Hiromasa Izumi	Especialista em Plantas Medicinais Período: 07/02/93 a 04/03/93
Dr. Masatoshi Sato	Especialista em Cultura de Tecido Período: 10/10/93 a 04/12/93
Dr. Yasuo Ueda	Especialista em Fitopatologia Período: 02/11/93 a 12/01/94
Dra. Keiko Kusuhara	Especialista em Corantes Naturais Período: 12/11/93 a 15/12/93 Período: 08/09/94 a 22/12/94
Dr. Takashi Watanabe	Especialista em Plantas Medicinais Período: 24/11/93 a 10/03/94 Período: 15/11/94 a 14/02/95
Dr. Stutae Ito	Especialista em Fitopatologia Período: 10/02/94 a 18/03/94
Dr. Jun Nakamura	Especialista em Entomologia Período: 15/09/94 a 14/12/94
Dr. Tetsuo Ohmura	Especialista em Óleo e Oleorresina Período: 11/11/94 a 10/02/95

Dr. Tadashi Kajita	Especialista em Isoenzimas Período: 15/11/94 a 14/01/95
Dr. Kiichiro Kawaguchi	Especialista em Fitoquímica Período: 10/03/95 a 09/06/95

Longo Prazo:

Dr. Masao Nishina	Líder do Projeto pela JICA Período: 25/08/90 a 24/03/94
Dr. Sueo Otake	Coord. Adm. do Projeto pela JICA Período: 15/09/90 a 13/03/94
Dr. Shingo Yoneyama	Especialista em Fitopatologia Período: 05/92 a 03/11/94
Dr. Osamu Shimizu	Especialista em Fruticultura Período: 10/11/93 a 10/06/95
Dr. Eishun Tokumori	Coord. Adm. do Projeto pela JICA Período: 03/02/94 a 06/96
Dr. Tadamitsu Endo	Especialista em Fitopatologia Período: 19/05/94 a 06/96
Dr. Tsuyoshi Eida	Líder do Projeto pela JICA Período: 19/05/94 a 06/96

Obs: O Dr. Shingo Yoneyama, por motivo de saúde, retornou ao Japão no dia 03/11/93.

ANEXO III

Pesquisadores do CPATU que receberam treinamento no Japão, de acordo com a área de capacitação

Pesquisador	Área	Período
Célio Francisco Marques de Melo	Óleo e Oleorresina	27/03/91 a 17/04/91
Sérgio de Mello Alves	Química (Análise Inst.)	27/03/91 a 19/06/91
Fernando C. de Albuquerque	Fitopatologia	12/08/91 a 11/10/91
Milton G. da Costa Mota	Biotechnology	12/08/91 a 13/11/91
Irenice A. Rodrigues	Plantas Medicinais	07/10/91 a 21/12/91
Ruth L. Benchimol Stein	Fitopatologia	07/10/91 a 21/12/91
Raimunda Fátima R. de Nazaré	Corantes Naturais	24/03/92 a 23/06/92
Sebastião Hühn	Óleo e Oleorresina	24/03/92 a 19/05/92
Osmar Alves Lameira	Biotechnology	24/03/92 a 02/06/92
Wilson Carvalho Barbosa	Óleo e Oleorresina	23/11/92 a 12/01/93
Ângela Maria Leite Nunes	Fitopatologia	23/11/92 a 18/01/93
Olinto Gomes da Rocha Neto	Fisiologia Vegetal	25/03/93 a 25/06/93
Márcia Maués Venturieri	Biologia Floral/Criação de insetos	23/03/93 a 04/07/93
Giorgio Cristino Venturieri	Manejo de Insetos Polinizadores	23/03/93 a 04/07/93
Dilson Augusto C. Frazão	Visita Técnica	16/10/93 a 12/11/93
José Guilherme S. Maia	Visita Técnica	16/10/93 a 12/11/93
Elisabeth Ying Chu	Microbiologia de Solo	12/09/93 a 21/12/93
Edson José Artiaga de Santiago	Plantas Medicinais	12/08/94 a 25/11/94
Marli Costa Poltronieri	Isoenzimas	25/09/94 a 16/11/94
Emanuel Adilson de Souza Serrão	Visita Técnica	04/10/94 a 03/11/94
Ilmarina Campos de Menezes	Biotechnology	31/10/94 a 15/02/95

ANEXO IV

Relação de equipamentos enviados pelo governo japonês ao CPATU

Ano	Equipamento / material	Quantidade
1990		
01	Water Bath (LB-160)	2
02	Water Bath (LB-260)	2
03	Water Bath (GA-11S)	2
04	Electronic Balance (EB-620S)	1
05	Electronic Balance (FR-300)	1
06	Vacuum pump (VP-15)	2
07	Laboratory wagon (SUS-2)	3
08	Chemicals	1
09	Medium Dispensor	1
10	pH meter (F-12)	1
11	Forceps	2
12	Autoclave (SV-240)	1
13	Autoclave (SV-300)	1
14	Autoclave (KY-230)	1
15	Autoclave (SV-300)	1
16	Automill (W-100)	1
17	Analytical high performance liquid chromatography(HPLC)	1
18	High performance thin layer chromatography (HPTLC)	1
19	Clean Bench (PCH-1303BN)	1
20	Shaker for culture (NR-20)	1
1991		
01	Botanical expeditionary vehicle	1
02	Meteorology detector system (LI-1200S/E)	1
03	Electrophoresis system (AE-6220)	1
04	Solid liquid extractor (SD-100)	1
05	Oil extractor	1
06	Steam evaporation apparatus (ASSS-100)	1
07	Fat extraction apparatus (B-428)	1

Ano	Equipamento / material	Quantidade
1991		
08	KF titration apparatus (E-658)	1
09	Portable photosynthesis	1
10	Water destilador (GS-60)	1
11	Gas chromatography (GCMS-QP2000A)	1
12	Melting point apparatus (MEL-270)	1
13	Ultra sonic washer (SUS-100)	1
14	Mantle heater (SAFR-10)	3
15	Mantle heater (SAFR-20)	2
16	Ice machine (RF-151ss)	1
17	Electric balance (EB-620S)	1
18	Electric balance, analytical (AEG-220)	1
19	Magnetic stirrer (MPG-360)	1
20	Blender (CB-6)	1
21	Viscosimeter (No2611-01)	1
22	Draft Chamber (GAP-1500P)	1
23	Deep freezer (ULT-1786-7)	1
24	Microscope (SZH-131)	1
25	Gas chromatography (GC-14APTF, C-R5A)	1
26	Microscope with photograph and phase contrast(FXA-B1)	1
27	Dehumidifier (RD 1603LD)	1
28	Incubator (LH-200-RD)	2
29	Scroll vaccum pump	1
30	Essential oil apparatus	2
1992		
01	SM-5400LV scanning microscope consisting of	1
02	Scanning microscope JSM-5400LV	1
03	Eucentric large specimen stage	1
04	Photo recording device	1
05	Backscattered electron detector	1
06	Image selector	1

Ano	Equipamento / material	Quantidade
1992		
07	Cooloing water circulator	1
08	Standard tool kit2	1
09	Spare parts for 2 years	1
10	Camera for scanning image	1
11	Automatic voltage regulator	1
12	NM-Ex90A FT-NMR system accesories consisting of	1
13	FT-NMR system (BU)NM-EX90A	1
14	EX standard program (NM-EX90A)	1
15	13C/1H observation kit	1
16	Sample kit (NM-ISK CH90E)	1
17	90A console (NM-90A)	1
18	LSI11/73 host computer unit	1
19	Memory board 1.2MW (NM-GMEM 1.2MW)	1
20	Color graphic display terminal	1
21	86MB winchester disk (NM-D2243EA)	1
22	Graphic plotter (NM-PL3002EA)	1
23	EX table (NM-EX TABLE)	1
24	Air compressor (NM-AC3)	1
25	Automatic voltage regulator (SVC-1030-J)	2
26	Automatic voltage regulator (SVC-10-220)	1
27	Spare parts for 2 years	1
28	Cooling water circulator (AU200J)	1
29	Rotor Model: RT5S4	1
30	Adapter 15x8 15ml x 32pcs	1
31	Adapter 10x10 10ml x 40pcs	1
32	Adpater 50x1 50ml x 4 pcs	1
33	Balancer spare parts	1
34	Glass tube 10ml 50 pcs/set	1
35	Glass tube 15ml 50 pcs/set	1
36	Glass tube 50ml 50 pcs/set	1

Ano	Equipamento / material	Quantidade
1992		
37	Fuse	5
38	Carbon brush 2 pcs/set	2
39	Refrigerated centrifuge (CR 2D2)	1
40	Clean bench model: (PCV 1303DNG3)	1
1993		
01	Rotary Evaporator (EL-131E-SW)	1
02	UV Handy Lamp (Pu-2)	
03	Rotary oil Vacuum Pump (D50-5)	1
04	Mini mil (SCM-40A)	2
05	Fraction Collector (SF-160)	1 SET
06	Micropjector for Microscopy (VD-15MH)	1 SET
	06.1 Microscopy (DAL-3)	
	06.2 Camera (CCD color)	
07	Data Base System	1 SET
08	Ultrasonic Cleaner (SUS-100)	1
09	Rotary Evaporator (EL 131E-SW)	1 SET
10	pH meter (F-12)	1
11	Infrared Spectrophotometer (IR-435)	1 SET
12	Hot Plates (M-3)	1
13	Binocular Microscope (NIKKON SMZ-10)	1 SET
14	Microscope (NIKKON DIAPHOT TMD-2S)	1 SET
15	Water Distillator (GS-100)	1
16	Shaking Incubator (SKL-1F)	1
17	Water Distillator (BU-5 SUS)	1
18	Dry Heater (2-2141 CPD-116S)	1
19	Temperature Gradient Chamber (TG-200-ADCT)	1
20	Balance Analytical (AEU-210)	1
21	Deep Freezer (DFW-20 2001)	1
22	System Cooling Multi Chamber (CMC-1S)	1

Ano	Equipamento / material	Quantidade
1993		
23	Byotron in door (LPH-300 RDS)	1
24	Byotron in door (LH-300 RD)	1
25	UV Spectrophotometer (UV-160A)	1
26	Byotron in door (LPH-300 RDS)	1
27	Byotron in door (LH-300 RD)	1
28	Microtome (MMTL-60)	1
29	Electrophoresis apparatus	1
30	Magnetic stirrer (MGS-06)	1
31	Incubador (MIR-252)	1
32	Vacuum Pump (UST-300)	1
33	Shaker, Water Bath (WS-240)	1
34	Vacuum Pump. Keney-type (KS-7)	1
35	Ion Sputtering Device(JFC-1500)	1
36	Freeze Drying Device (JFC-300)	1
37	Glassware for Chemicals analyses	1SET
1994		
01	Desiccator (LH)	1
02	Magnetic Stirrer (SR-100)	1
03	Magnetic Stirrer (SR-200)	1
04	Water Distilling Apparatus (36-113-3.000)	1
05	Illuminometer (DX-100)	1
06	Microstereoscope (M-900)	1
07	Micro Pipet (ACDM-1.000)	1
08	Auto Pipet Pipetus	1
09	Haemacytometer (A-104)	1
10	Hot Plate Stirrer (SR-350)	1
11	Electric Balance (AEG-320)	1
12	Refractometer (HSR-500)	1
13	Hot Plate (TP-320)	1

Ano	Equipamento / material	Quantidade
1994		
14	Pipe Heater (KSW-1A)	3
15	Pipe Heater (KSW-1B)	3
16	Stirrer (FL-135)	1
17	Heating Mantles (TAF-3)	2
18	Heating Mantles (TAF-10)	2
19	Aspirator (WJ-20)	1
20	Hot Plate (2235M)	1
21	Hot Plate (2245M)	1
22	Three-One-Motors (1200GM)	1
23	Muffle Furnaces (F48025)	1
24	Jack (995-55-31-04)	1
25	Grinding Apparatus (ANM-200)	1
26	Electric Balance (EB-620S-A)	1
27	Electric Balance (AEG-320)	1
28	Microtome (PR-50)	1 SET
29	Electric Balance (AEG-220)	1
30	Hot Air Rapid Drying Oven (SPH-116S)	1
31	Lon Temperature Water Bath (DFW-20)	1
32	Vacuum Freezing Dryer (VFD-312)	1 SET
33	Low temperature Cooler (CMC-1S)	1
34	Stereoscope (SMZ-U)	1
35	Water Distillation Apparatus (BU-5)	1
36	Flasks, Columns, Reagents and Membrans for HPLC	1 SET
37	Vacuum Freezing Dryer (TR-BT-3-50)	1
38	Demineralizers for HPLC (MP-190)	1 SET
39	Microstereoscope (M893)	1
40	Hot Air Rapid Drying Oven (DF-100)	1
41	Water Bath (10-0822)	1
42	Ph Meter (HM-14P)	1

Ano	Equipamento / material	Quantidade
1994		
43	Hi-Wagon (WSN-4)	1
44	Digital Thermal Anemometer (ISA-21D)	1
45	Aspiratory Psychrometers (8031-05)	1
46	Microtome (PR-50)	1 SET
47	Stereoscope (SHZ)	1
48	Rotary Evaporator (R-124-EW)	1
49	Drying Oven (SNS-113S)	1
50	Ultrasonic Cleaner (SUS-100)	1
51	Hot Plate (NP-6)	1
52	Aspirator (T-201)	1

ANEXO V

Investimentos feitos pela EMBRAPA-CPATU como contra-parte no Convênio de Cooperação Técnica com a JICA

Ano	Pessoal	Encargos	Construções	Infra-estrutura	Total US\$ 1.00
1990	163,000	26,000	16,000	8,000	213,000
1991	326,000	42,000	39,000	32,000	439,000
1992	552,200	101,000	57,000	46,000	756,200
1993	991,344	301,000	202,000	190,000	1.684,344
1994	915,000	366,000	-	-189,000	1.470,000
1995	457,000	180,000	-	-	637,000
Total	3.404,544	1.016,000	314,000	276,000	5.199,544

